

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-506360

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)7月21日

(51) Int.Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 5/10			
A 6 1 K 35/12		7431-4C	
37/02	A D T	8314-4C	
		8412-4B	C 1 2 N 5/ 00
		9050-4B	15/ 00
			B
			A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平4-509427
(86) (22) 出願日 平成4年(1992)3月11日
(85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)9月10日
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 2 / 0 1 9 6 8
(87) 国際公開番号 W O 9 2 / 1 5 3 2 3
(87) 国際公開日 平成4年(1992)9月17日
(31) 優先権主張番号 6 6 7 , 2 7 4
(32) 優先日 1991年3月11日
(33) 優先権主張国 米国 (U S)
(81) 指定国 E P (A T , B E , C H , D E ,
D K , E S , F R , G B , G R , I T , L U , M C , N
L , S E) , A U , C A , J P

(71) 出願人 クリエイティブ バイオモレキュルズ イ
ンコーポレイテッド
アメリカ合衆国 01748 マサチューセッ
ツ, ホプキントン, サウス ストリート
35
(72) 発明者 コーエン, チャールズ エム.
アメリカ合衆国 02053 マサチューセッ
ツ, メドウェイ, ウィンスロプ ストリ
ート 98
(74) 代理人 弁理士 藤野 清也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質により誘導される形態形成

(57) 【要約】

1) 形態形成蛋白(モルフォゲン)を特徴づけるアミノ酸配列データ、構造面、ホモロジー性そして様々の他のデータ、2) 天然および組み換えソースからおよび合成構築物からこれら蛋白質を生産する方法、3) これらの形態形成蛋白と適切に修飾された組織、特異的なアトリックスから成る形態形成用具、4) 哺乳動物において非軟骨形成性組織の成長を誘導する用具、を開示する。

請求の範囲

1. 哺乳動物の中の始原細胞の数を増加させるための組成物であって、始原細胞群が刺激されて増殖するのに十分な濃度と時間で生体系でモルフォゲンにさらすことによって刺激された始原細胞群を含むもの。
2. 哺乳動物の中で非軟骨形成性組織の成長を誘導するための組成物であって、その始原細胞群が、生体内で組織の局所に置かれたとき、前記局所において、その非軟骨形成性組織に特異な分化および増殖ができるようにするために十分な濃度と時間モルフォゲンにさらすことによって刺激された始原細胞群を含むもの。
3. 請求項1または2の組成物であって、前記始原細胞群が造血性の多能性幹細胞群である組成物。
4. 請求項1または2の組成物であって、前記始原細胞群が間充嚢由来である組成物。
5. 哺乳動物の組織局所に非軟骨形成性の置換組織の形成を誘導するための組成物であって、前記組織に特異な成分を持ち、形態形成を許容する組織特異な環境を提供することができる、生体適合性のある非細胞のマトリックスと、前記マトリックス上に吸収されかつ置換組織を必要とする組織特異な局所に置かれたとき、前記局所に複数の発達段階をたどる組織形態形成を誘導することができるようなモルフォゲンを含むもの。
6. 哺乳動物の組織局所に非軟骨形成性の置換組織の形成を誘導するための組成物であって、形態形成を許容す

(f x) (Seq. ID No. 14) からなるグループから選ばれた配列の1つと少なくとも70%の相溶性があるアミノ酸配列を含むもの。

12. 請求項11の組成物であって、前記モルフォゲンが、前記グループから選ばれた配列の1つと少なくとも80%の相溶性のあるアミノ酸配列を含むもの。

13. 請求項12の組成物であって、前記モルフォゲンが Seq. ID No. 5 (hOP1) の残基43-139の配列と60%よりも大きい同一性があるアミノ酸配列を含むもの。

14. 請求項13の組成物であって、前記モルフォゲンが Seq. ID No. 5 (hOP1) の残基43-139の配列と65%よりも大きい同一性があるアミノ酸配列を含むもの。

15. 始原細胞群の増殖を刺激するのに十分な濃度とある時間、始原細胞群をモルフォゲンと接触させるステップを含むことからなる、始原細胞群個体数を増加させる方法。

16. 哺乳動物内で始原細胞の数を増加させるための請求項15の方法であって、前記刺激された始原細胞群を、哺乳動物体内でその始原細胞の個体数を増加させるために、前記哺乳動物に入れるもう1つのステップを含む方法。

17. 哺乳動物の中で非軟骨形成性組織の成長を誘導するための方法であって、その始原細胞群が、生体内で組織特異な局所に置かれたとき、前記局所において、その

組織特異な環境を提供することができる、生体適合性のある非細胞マトリックスと、前記マトリックス上に吸収させ、置換組織を必要とする組織特異の局所に与えたとき、前記局所に複数の発達段階をたどる組織形態形成を誘導することができるようなモルフォゲンを含むもの。

7. 請求項5または6の組成物であって、前記マトリックスが体内で分解され得るものである組成物。

8. 請求項5または6の組成物であって、前記マトリックスが器官特異の組織から作られたものである組成物。

9. 請求項5または6の組成物であって、前記マトリックスが、コラーゲンおよびグリコサミノグリカン類およびプロテオグリカン類からなるグループから選ばれる細胞付着因子群を含むもの。

10. 請求項5または6の組成物であって、前記マトリックスが、前記哺乳動物の体からの移動してくる始原細胞群の流入、分化および増殖を許容するに十分な寸法の孔を持つもの。

11. 請求項1、2、5または6の組成物であって、前記モルフォゲンが、hOP1 (Seq. ID No. 5)、mOP1 (Seq. ID No. 6)、hOP2 (Seq. ID No. 7)、mOP2 (Seq. ID No. 8)、CBMP2A (f x) (Seq. ID No. 9)、CBMP2B (f x) (Seq. ID No. 10)、DPP (f x) (Seq. ID No. 11)、Vg1 (f x) (Seq. ID No. 12)、Vgr-1 (f x) (Seq. ID No. 13) および GDP-1

非軟骨形成性組織に特異な分化と増殖ができるようにするために十分な濃度と時間で、始原細胞をモルフォゲンに接触させるステップを含む方法。

18. 請求項14または15の方法であって、前記始原細胞群が間充嚢由来である方法。

19. 始原細胞群が刺激されてそれらの表現型を発現するのに十分な濃度と時間、始原細胞群をモルフォゲンと接触させるステップを含む、哺乳動物中の分化細胞群の表現型の発現を維持する方法。

20. 請求項19の方法であって、前記分化細胞群が老化性または静止性の細胞群である方法。

21. 哺乳動物の組織局所に非軟骨形成性組織成長を誘導するための方法であって、前記組織局所に、モルフォゲンを、該タンパク質が形態形成を許容する組織特異な局所に与えられたとき、前記局所に複数の発達段階をたどる組織形態形成を誘導することができるような濃度と時間、与えることを含む方法。

22. 請求項21の方法であって、前記非軟骨形成性組織が肝組織であり、前記組織局所が肝臓である方法。

23. 請求項22の方法であって、前記プロテインが生体適合性のある非細胞性のマトリックスとともに前記局所に与えられる方法。

24. 請求項23の方法であって、前記マトリックスが前記組織に特異性のある成分群を含むものである方法。

25. 請求項23の方法であって、前記マトリックスが体内で分解され得るものである方法。

26. 請求項23の方法であって、前記マトリックスが特異特異の組織から作られるものである方法。

27. 請求項23の方法であって、前記マトリックスがコラーゲンおよび前記組織に特異の細胞付着因子群を含む方法。

28. 請求項23の方法であって、前記マトリックスが前記哺乳動物の体から移動してくる始原細胞群の流入、分化および増殖を許容する十分な寸法の孔を有する方法。

29. 請求項14、15、17または20の方法であって、前記モルフォゲンがhOP1 (Seq. ID No. 5)、mOP1 (Seq. ID No. 6)、hOP2 (Seq. ID No. 7)、mOP2 (Seq. ID No. 8)、CBMP2A (fx) (Seq. ID No. 9)、CBMP2B (fx) (Seq. ID No. 10)、DPP (fx) (Seq. ID No. 11)、Vgl (fx) (Seq. ID No. 12)、Vgr1 (fx) (Seq. ID No. 13) およびCDF1 (fx) (Seq. ID No. 14) から成るグループから選ばれた配列の1つと少なくとも70%の相溶性を有するアミノ酸配列を含むものである方法。

30. 哺乳動物の肝臓の損傷組織局所に肝組織の形成を誘導する方法であって、

少なくともhOP-1 (Seq. ID No. 5) のアミノ酸残基43-139を有するモルフォゲンの治療量を前記局所に与えることを含む方法。

31. ヒトの組織の機能不全を診断する方法であって、

ら選ばれたものである方法。

35. 非軟骨形成性の哺乳動物組織の成長の誘導に用いる医薬品の製造に有用なモルフォゲン。

36. 始原細胞の増殖の誘導に用いる医薬品の製造に有用なモルフォゲン。

37. 哺乳動物の分化細胞群の表現型発現の維持に用いる医薬品の製造に有用なモルフォゲン。

38. 肝組織の成長の誘導に用いる医薬品の製造に有用なモルフォゲン。

39. 請求項35、36、37または38のモルフォゲンであって、hOP1 (Seq. ID No. 5)、mOP1 (Seq. ID No. 6)、hOP2 (Seq. ID No. 7)、mOP2 (Seq. ID No. 8)、CBMP2A (fx) (Seq. ID No. 9)、CBMP2B (fx) (Seq. ID No. 10)、DPP (fx) (Seq. ID No. 11)、Vgl (fx) (Seq. ID No. 12)、Vgr1 (fx) (Seq. ID No. 13) およびCDF1 (fx) (Seq. ID No. 14) から成るグループから選ばれた配列の1つと少なくとも70%の相溶性を有するアミノ酸配列を含むもの。

40. 請求項39のモルフォゲンであって、前記グループから選ばれた配列の1つと少なくとも80%の相溶性を有するアミノ酸配列を含むもの。

41. 肝臓細胞の成長を抑制するための医薬品の製造に有用なモルフォゲン。

て、次のステップ

(a) ヒトの中に存在する内在性の抗-モルフォゲン抗体の濃度を検出するステップを、1つの時間間隔で繰り返すこと、

(b) 前記検出された濃度を比較すること、検出された濃度の変化が前記組織の状態を示す、を含む方法。

32. 組織の状態を評価する方法であって、前記組織中に存在するモルフォゲンの濃度を検出するステップを含む方法。

33. 請求項32の方法であって、さらに

(a) 前記組織中に存在するモルフォゲンの濃度を検出するステップを一定時間間隔で繰り返すこと、

(b) 前記検出された濃度を比較すること、前記検出された濃度の変化がその組織の状態を示す、を含む方法。

34. 請求項33の方法であって、前記モルフォゲンがhOP1 (Seq. ID No. 5); mOP1 (Seq. ID No. 6); hOP2 (Seq. ID No. 7); mOP2 (Seq. ID No. 8); CBMP2A (fx) (Seq. ID No. 9); CBMP2B (fx) (Seq. ID No. 10); DPP (fx) (Seq. ID No. 11); Vgl (fx) (Seq. ID No. 12); Vgr1 (fx) (Seq. ID No. 13); およびCDF1 (fx) (Seq. ID No. 14) で構成されるグループか

42. モルフォゲンを有する治療薬。

43. 組織の成長を誘導するための治療薬で、モルフォゲンを有する治療薬。

44. 分化細胞群の表現型発現を誘導するための治療薬で、モルフォゲンを有する治療薬。

45. 肝臓細胞の増殖を誘導するための治療薬で、モルフォゲンを有する治療薬。

明 細 書

タンパク質により誘導される形態形成

発明の背景技術

この発明は、哺乳動物の体内で組織の形態形成を誘導する形態形成タンパク質、これらのタンパク質を同定する方法およびこれらのタンパク質を天然のソースから得る方法またはこれらのタンパク質の遺伝暗号を組み込んだ組換えDNAを発現させることによりこれらのタンパク質を生産する方法、組織特異性のある非細胞マトリックスの作成、組織の安定状態の維持、修復および再生を促進する方法、およびこれらのタンパク質を用いて治療細胞集団を増大させる方法に関する。

細胞の分化は、形態形成の中心的な特徴であり、胚に始まり、生物が生きている間ずっと、成体の組織の修復および再生メカニズムのなかでさまざまな程度に続く。成体の組織における形態形成の程度は組織によって異なり、とりわけその組織の細胞の代謝回転の程度に関係する。この点にもとづいて、組織は三つの大きなカテゴリーに分類される：(1) 細胞分裂が無くかつ初期の発生段階で形成された細胞の大部分が成体が生きている間ずっと生き残る、神経や骨格筋のような静止細胞集団を含む組織、(2) 一般的にはほとんど細胞分裂はしないが、適当な刺激に反応して細胞が分裂し同じ分化型の細胞を産み出す、肝臓のような、条件により再生する集

団を含む組織、(3) 成体における速くかつ継続的な代謝回転を特徴とする、血液、精巣、重層扁平上皮を含む、一生の間再生する細胞集団を含む組織。このような組織では、最終分化細胞は比較的短かい寿命を持ち、幹細胞または始原細胞として知られる異なる異なる細胞の増殖によって取って代わられる。

これらの細胞の分化のための刺激を制御する細胞および分子事象は、盛んに研究が行われている分野である。医学分野では、細胞の分化および組織の形態形成を制御する因子(因子類)の発見は、病気にかかったまたは損傷した哺乳動物の組織や器官を修復または再生する技術の能力を大いに発展させるものと期待される。特に役に立つ分野には、再建外科や、関節炎、肺炎腫、骨粗しょう症、心筋症、肝硬変、変性神経症などの組織変性疾患の治療が含まれる。

近年、細胞分化に役割を果たすと見られる多数の異なる因子が単離された。これらの因子群のうちのいくつかは、トロソフィラ(ショウジョウバエ)に確認されているNCTCH遺伝子およびゼノブス(アフリカツメガエル)に確認されているそれと同様のXOTCH遺伝子のような遺伝子転写活性化因子、それにケノラプディティス エレガンスに確認されている複数の転写活性化因子である。

遺伝系は、その継続的に再生する細胞集団のために集中的な研究が行われている分野である。細胞の再生に関与している可塑性のあるこの系で確認されている因子に

は、インターロイキン3(IL-3)、エリトロポエチン、CSF群(GM-CSF、G-CSF、M-CSFその他)および多数の幹細胞成長因子がある。

細胞の分化に役割を果たすと考えられているその他のタンパク質類には、インシュリン様成長因子(IGF)ファミリーのメンバーであるタンパク質類、ヘパリンに結合する成長因子ファミリーのメンバーであるタンパク質群(例えば、PGF-α酸性およびアルカリ性の繊維芽細胞成長因子およびECDGF-胎児性癌腫派生の成長因子)や、いくつかの形態転換がん遺伝子(hstおよびint-2、例えば、Heath 他(1998)、J. Cell Sci. Suppl. 10:256-256参照)がある。細胞性粘着で確認されているDIF(分化誘導因子)は、その生体内に予め持っている細胞の分化を方向づけるもう1つの生体調節タンパク質である。

TGF-βスーパーファミリーのタンパク質と構造的に似ているタンパク質群も、種々の発生事象に関与すると確認されている。例えば、TGF-βやインヒビリン/アクチビン グループのポリペプチドは、細胞の成長および分化を制御する働きをするらしい。MIS(ミューラ管抑制性物質)は、哺乳動物の雄胎児の発生中にミューラ管の退行を引き起こす。また、トロソフィ(ショウジョウバエ)のdecapentaplegic複合体の遺伝子産物であるDPPは、正しい胃-腸の分化に必要なものである。同様に、Vg-1はゼノブスの中胚葉の誘導に関与し、またVg-1は発生しつつあるマウス

の異なる組織中に確認されている。

多くの情報を明らかにするもう一つのソースは、骨の形態形成の分野である。骨のモデルシステムの開発と研究は、骨の分化の発達の段階が、間充細胞のケモタキシス(走化)、これらの始原細胞の増殖、これらの細胞の軟骨芽細胞への分化、軟骨の石灰化、血管の侵入、骨の形成、再形成、そして最後に骨髄の分化から成ることを確認した(Reddi (1981) Collagen Rel. Res. 1:209-206)。マトリックスと一緒に入れられたとき哺乳動物の体内で軟骨内の骨形成を誘導する能力のあるタンパク質は、現在多数の異なる哺乳動物の種において確認されており、またこれらのタンパク質を遺伝暗号化している遺伝子も確認されている(例えば、米国特許No. 4,968,590および米国特許No. 5,011,691、Oskaynak 他、(1990) EMBO J. 9:2085-2093およびOskaynak 他、(1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 179:116-123、および1992年2月21日出願のUSSN 07/841,646参照)。これらのタンパク質は、相互にアミノ酸配列の相関性が高く、TGF-βスーパーファミリーのタンパク質の多数のメンバーと構造が類似しており、適当に修飾されたマトリックスと一緒に哺乳動物に入れられたとき軟骨内骨形成および/または軟骨形成を誘導することが示されている。他の組織に、同じような複数発生段階の形態形成を誘導すること

ができるタンパク質は、まだ確認されていない。

本発明の一つの目的は、骨または軟骨とは異なる哺乳動物のいろいろな組織に、複数の発達段階をたどる形態形成を誘導することができる形態形成タンパク質類（“モルフォゲン類”）およびこれらのタンパク質類を調定する方法を提供することである。この形態形成活性は、始原細胞の増殖および分化を誘導する能力と、成体の組織の形成に至る一連の事象を通じて分化した表現型を支援し維持する能力を含む。もう一つの目的は、これらのタンパク質を遺伝子として発現している遺伝子、および組織内DNA技術を用いて天然のソースまたは合成ソースのどちらからでもこれらのタンパク質を発現させ導出する方法を提供することである。さらにもう一つの目的は、これらのタンパク質と組み合わせ使用できる組織特異性のある非細胞マトリックスを提供することである。その他の目的には、哺乳動物内で始原細胞集団を増大させる方法、生体内または試験管内で始原細胞を誘導して分化させそれらの細胞の分化した表現型を維持する方法、生体内で組織特異的な成長を誘導する方法、および生体内の病気ににかかったまたは損傷した組織を取り替える方法を提供することが含まれる。本発明のこれらのおよびその他の目的と特徴は、以下の説明、図および請求項から明らかになるであろう。

発 明 の 要 旨

本発明は、哺乳動物内で複数の発達段階をたどる組織

形態形成を誘導することができる形態形成タンパク質類（“モルフォゲン類”）を提供する。特に、これらのタンパク質は、未分化の始原細胞の増殖を誘導することができ、そして適当な環境条件のもとで組織特異的にこれらの刺激された始原細胞の分化を誘導することができる。さらに、このモルフォゲン類は、これらの分化した細胞の成長と維持を支援することができる。これらの形態形成活性は、この発明のタンパク質類が、形態形成を許容する環境において、複数の発達段階をたどる組織の形態形成を開始させかつ持続させること、すなわち組織特異的に幹細胞を刺激して増殖させ分化させて、新しい組織の形成で完結する一連の事象を誘導することを可能にする。これらの形態形成活性はまた、本発明のタンパク質類が、先にそれらの分化の道筋から外れるように誘導された細胞の“再分化”を刺激することも可能にする。適当な環境条件のもとでは、これらのモルフォゲン類が、分化した細胞の“脱分化”を刺激することができるかも知れないことが期待される（下記参照）。

本発明の一面において、本発明のタンパク質類および組成物は、哺乳動物内の病気ににかかったまたは損傷した組織を取り替えるのに、とりわけ損傷した組織が正常な組織や器官の機能を妨げるときに、役に立つ。したがって、本発明のタンパク質類が、例えば、肺炎腫の結果傷んだ肺の組織、硬変した腎臓や肝臓の組織、心筋症および/または動脈硬化あるいは心臓塞栓による発作によって生じる得る心臓や血管の傷んだ組織、潰瘍性瘻孔また

はその修復で傷んだ胃の組織、物理的な負傷またはアルツハイマー病や多発性硬化症や発作などの変性病で傷んだ神経組織、病気に物理的な負傷の結果生じることがある象牙質の組織、などの損傷した組織の修復に役立つことが期待される。本発明のタンパク質類が組織に特異的な局所に与えられたとき、またはそれらの発現が組織に特異的な局所において刺激されたとき、複数の発達段階をたどる組織形態形成が誘導される。その組織内でモルフォゲンの発現を刺激することができるタンパク質類または因子との接触により刺激された細胞を、組織の局所に与えてもよい。これらの場合には、そこに存在する組織が必要なマトリックスの条件を提供する。すなわち、形態形成が可能な環境において細胞を増殖させかつ分化させるための好適な培養基台を提供し、さらに発生しつつある組織の組織特異性を指示するために必要な信号類を提供する。あるいはまた、本発明のタンパク質類または刺激された細胞を、調整されたマトリックスと組み合わせ、生体内の局所にデバイスとして移植してもよい。この調整されたマトリックスは、生体適合性があり、好ましくは体内分解性があり、後送される特徴を持つ、適正に修飾された、組織特異性のある非細胞マトリックスでなければならない。

多くの場合、組織の機能の喪失は、最初のまたは繰り返し受けた損傷に反応して形成されるはん成組織が原因となって生じる。はん成組織の形成の程度は、一般的には、損傷した組織の再生特性および損傷の程度と種類に

よって異なる。したがって、別の面において、本発明は、新たに損傷した組織の局所にモルフォゲン類またはモルフォゲンで刺激された細胞をつけることにより、はん成組織の形成を防止するかまたは殆んど完全に抑制するために使用できるかもしれないモルフォゲン類も含む（下記参照）。

本発明のモルフォゲン類はまた、哺乳動物において始原細胞または幹細胞の集団を増大または再生させるためにも使用できるであろう。例えば、始原細胞を個人の骨髄から単離し、体外でそれらの細胞を誘導して増殖させるのに十分な時間とモルフォゲン濃度で刺激してから、骨髄に戻すことができる。選んでいるかもしれない他の始原細胞のソースには、培養された細胞の系統から取られ、培養中に刺激され、それから体内に入れられる、生体適合性のある細胞が含まれる。あるいはまた、モルフォゲン類を、全身に投与するか、または埋め込み、注入、その他の方法により個人の体内で始原細胞集団に与えて、その始原細胞集団の分裂促進活性を誘導することもできるであろう。例えば、対象とする始原細胞集団においてモルフォゲンの発現を刺激することができる因子を、例えば全身投与により、体内でその細胞群に与えて、分裂促進活性を誘導することができるであろう。同様に、本発明のモルフォゲン類により、例えば、個人の血液を血液して対象とする細胞を抽出し、これらの細胞を体外で刺激し、刺激された細胞を血液に戻すことによって、造血幹細胞の数を増加させることができるであろう。個

人の増殖細胞の数を増大させることができるこの能力は、再生可能な細胞の増減または数の減少から起きる異常にたいする現在の治療方法を著しく強力にするであろうと期待される。2つの特に重要な応用は、血液疾患の治療と、低下したまたは失われた免疫機能の治療である。その増殖を利用できるかもしれない他の細胞集団は、皮膚組織の再生に使えるかもしれない表皮の幹細胞や、例えば潰瘍の治療に使えるかもしれない胃腸内壁の幹細胞である。

本発明のさらにもう1つの面において、本発明のモルフォゲン類はまた、既存の分化した細胞がそれらの表現型を表現し続けるように誘導することにより、分化細胞の成長と維持を支援するためにも使用できる。この活性は、骨粗しょう症において起こるように細胞が老化または静止することによって機能の喪失が引き起こされる組織の疾病の治療において、特に役に立つことが期待される。これらの細胞を刺激してそれらの表現型を表現させそれによって機能障害の影響を顯著に軽減させ続けるためには、治療されるべき細胞に対する直接的このタンパク質の塗布または全身注入によるその投与が使用できるかもしれない(下記参照)。あるいはまた体内でモルフォゲンの発現を刺激できる因子を投与してもよい。さらに、この発明のモルフォゲン類はまた、遺伝子治療の計画において、静止した細胞の成長を刺激しそれによってこれらの細胞の外來のDNAを取り込む能力を潜在的に高めるためにも使用できるであろう。

本発明のさらにもう1つの面において、本発明のモルフォゲン類はまた、腫瘍形成中に起こり得るようにそれらの分化の道筋から外れてしまった細胞の“再分化”を誘導するためにも使用できるであろう。本発明のタンパク質類のこの活性は、新生物(腫瘍)の成長を遅くするかまたは実質的に禁止するための治療に特に役に立つであろうと期待されている。この方法はまた、またこれらの細胞の再分化および再分化を誘導することも期待される。上述したように、これらのタンパク質類は細胞に直接にまたは全身投与により与えてもよい。また体内でモルフォゲンの発現を刺激することができる因子を与えてもよい。

最後に、内発性のモルフォゲンのレベルの変化は、組織の機能不全を検出するための方法の一部として監視できるであろう。具体的には、内発性のモルフォゲンレベルの変化は、組織あるいは器官の静止状態の変化を反映すると考えられる。組織の静止状態は、モルフォゲン自体のレベルの変化を検出することによって監視できるであろう。例えば、組織のサンプルを一定時間間隔で採取し、その組織中に存在するモルフォゲンの濃度を、この分野に習熟した人々に知られている標準的なタンパク質検出手段によって検出することができる。一例として、対象とするモルフォゲンと特異的に相互作用し得る適合タンパク質、例えば抗モルフォゲン抗体が、標準的な免疫検定において、モルフォゲンを検出するために使用できる。それによって検出されたモルフォゲンのレベルを

比較することが可能になり、検出レベルの変化が組織の状態を示す。内発性のモルフォゲンのレベルの変化はまた、モルフォゲン類に対する体の自然の抵抗力値の変化を検出することによっても監視できる(下記参照)。

本発明の形態形成タンパク質類および組成物は、各種の天然に存在するソースから単離することでもできるし、従来の組換えDNA技術を使って生合成により作ることでもできる。同様に、マトリックス類は、器官特異的組織から誘導することでもできるし、後述するように合成によって調整することでもできる。

これらの発展のかぎは、天然に存在する骨原性タンパク質類の発見と特徴の決定、および続くそれらの注目すべき作用の観察であった。これらのタンパク質類は、もともと骨から単離され、適正に単離されたマトリックスとともに哺乳動物の体内に入れられたとき、血管形成、石灰化、および骨髄の分化を含む骨形成の全発達段階を誘導することができる。この多段階発達を誘導することができる天然のタンパク質類と、これらのタンパク質を遺伝暗号化しているDNA配列群は、複数の異なる種において単離され、特徴が決定されている(例えば、ヒトおよびマウスOP-1、OP-2、およびCBM-2。例えば、米国特許No. 4,958,590およびNo. 5,011,691; 1992年2月21日出願の米国特許出願No. 841,646; Sampath 他(1990) J. Bio. Chem. 265: 13198-13205; Oskaynak 他(1990) EMBO J. 9: 2085-2093およびOskaynak 他(1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 179: 116-123 参照)。これらのタンパク質類の成熟型は、特に成熟タンパク質のC-末端領域において、実質的なアミノ酸配列の相同性がある。特にこれらのタンパク質類は、この領域に、保存された6または7システインの骨格を持つ(例えば、C-末端のこれらのシステイン残基の直線配列は、他の明らかに必要なアミノ酸類に加えて、異なるタンパク質類に不可欠に保存されている(下記の表2参照))。

通常は骨や骨の形成に関係しないが、骨原性のタンパク質類のC-末端と殆んど完全なアミノ酸配列の相同性があり、6システインまたは7システインの保存骨格を含むポリペプチド鎖もまた、哺乳動物において骨を誘導することができることが確認されている。これらのポリペプチド鎖のなかには、ドロソフィラおよびゼノプスで確認されているアミノ酸配列群がある(例えば、DPP およびVgl。例えば、米国特許No. 5,011,691および下記の表2参照)。さらに、これらの配列の相同性からの外挿(補外)にもとづいて設計された、6または7システインの保存骨格を含む、非天然の生合成による構造は、適当なマトリックスとともに移植されたとき、哺乳動物類において軟骨内の骨形成を誘導することが示されている(米国特許No. 5,011,691および下記の表3参照)。

現在では、実質的に相同なアミノ酸配列とらまたは7システインの保存骨格を共通に持つこのタンパク質の“ファミリー”は、骨および軟骨に加えて、多種の他の器官や組織に対しても組織特異な形態形成を誘導することができる真のモルフォゲン様であることが発見されている。このタンパク質類は、明らかに要因レセプターに結合するかまたは他の方法で始原細胞と接触し相互作用して、形態形成を許容する環境においてそれらの細胞に要因を与えるかまたは刺激して増殖させ分化させる。これらのモルフォゲン類は、自然に発生する組織によって必要とされる血管形成、結合組織の形成および神経の侵入などを含む、器官特異な新しい組織の形成で完結する複数の発生段階をたどる細胞および分子事象を、誘導することができる。

細胞の分化の仕方、例えばそれらが骨を作る骨芽細胞、造血細胞、または肝細胞のどれに分化するかは、それらの局所的な環境に依ることも発見されている（下記参照）。したがって、増殖し分化しつつある細胞は、その上に固着するための適した基台を必要とすることに加えて、それらの組織特異性を方向づけるための適正な信号源をも必要とする。これらの信号源は、細胞の要因の種類の形を取ってもよい。

このモルフォゲン類（またはこれらのモルフォゲン類によって刺激された始原細胞群）が組織に特異な局所に与えられたとき（例えば、全身注入によるかまたは組織の特異な局所への埋め込みまたは注入によるか、さらに

は体内でモルフォゲンの発現を刺激することができる因子を投与することによる）、その局所の既存の組織は、病気にかかっていたり損傷したりしていても、適したマトリックスとして働く能力を持つ。あるいはまた、その損傷した組織がこうなっている傷みの程度がひどいときに必要であるかもしれないように、刺激された始原細胞群またはモルフォゲンと一緒に調整したマトリックスを外部から与えることもできる。このマトリックスは、生体適合性があり、移動する始原細胞群の侵入、分化および増殖を許容する大きさを持つ適切に修飾された非細胞マトリックスであって、さらに形態形成を許容する環境を提供することができなければならない（下記参照）。このマトリックスは組織特異性がありかつ体内分解可能であることが好ましい。

調整マトリックスは、脱水された器官特異の組織から、例えばその組織を溶剤で処理してその組織からほとんど非構造要素を除去することにより作成できる。あるいはまた、このマトリックスは、生体適合性があり、好ましくは生体内で生物分解可能なコラーゲンのような構造高分子を、適当な組織特異性のある細胞付着因子と共に用いて、合成により調整することもできる。現在好ましい構造高分子は、組織特異なコラーゲンを要素として含む。現在好ましい細胞付着因子には、グリコサミングリカン類およびプロテオグリカン類などがある。このマトリックスはさらに、その哺乳動物の体内から移動する始原細胞群の侵入、増殖および分化を促進するように、表面

の細孔や微小なくぼみの数を増加させるために、一つまたは複数の薬品で処理してもよい。

この発明において役に立つタンパク質類には、OP-1、OP-2、CBMP-2タンパク質のような当初骨原性のタンパク質類として確認されたタンパク質類や、DPP（ドロソフィラ由来）、Vgl（ゼノプス由来）、Vgr-1（マウス由来、表2およびSeq. ID No. 5-14参照）などのアミノ酸配列が類似したタンパク質、および近年確認されたGDF-1タンパク質（Seq. ID No. 14）がある。このファミリーのメンバーTGF-βスーパーファミリーのタンパク質を含む一は、それらのC-末端領域に、実質的に相同なアミノ酸配列を共通に持っている。下記の表1は、現在までに確認されている多数のモルフォゲン類を、この明細書で使用している名前と配列識別番号と共に示す。

表 1

OP-1 OP-1タンパク質を遺伝暗号化しているDNA配列の1部分または全体から発現される形態形成にたいして活性なタンパク質のグループを全体的に指し、その対立性変異および種間変異、例えば、ヒトのOP-1 (“hOP-1” Seq. ID No. 5、成熟タンパク質のアミノ酸配列)またはマウスのOP-1 (“mOP-1” Seq.

q. ID No. 6、成熟タンパク質のアミノ酸配列)も含む。7システインの保存骨格は、Seq. ID No. 5および5の残基38から139によって構成されている。このタンパク質類の全長を暗号化しているcDNA配列およびアミノ酸は、Seq. ID No. 16および17 (hOP1) およびSeq. ID No. 18および19 (mOP1) で与えられる。成熟タンパク質類は、残基293-431 (hOP1) および292-430 (mOP1) によって構成される。このタンパク質類の、切断されると成熟した形態形成活性なタンパク質を生じる“pro”領域は、実質的に、アミノ酸残基30-292 (hOP1) およびアミノ酸残基30-291 (mOP1) によって構成されている。

OP-2 OP-2タンパク質を遺伝暗号化しているDNA配列の1部分または全体から発現される活性なタンパク質のグループを全体的に指し、その対立性変異および種間変異、例えば、ヒトのOP-2 (“hOP-2” Seq. ID No. 7、成熟タンパク質のアミノ酸配列)またはマウスのOP-2 (“mOP-2” Seq. ID No. 8、成熟タンパク質のアミノ酸配列)も含む。

7システインの保存骨格は、Seq. ID No. 7および8の残基38から139によって構成されている。このタンパク質類の食長を暗号化しているcDNA配列およびアミノ酸は、Seq. ID No. 20および21(hOP2)およびSeq. ID No. 22および23(mOP2)に示されている。成熟タンパク質類は、実質的にアミノ酸残基264-402(hOP2)および261-399(mOP2)によって構成されている。このタンパク質類の、切断されると成熟した形態形成活性なタンパク質を生じる"pro"領域は、実質的に、アミノ酸残基18-253(hOP2)およびアミノ酸残基18-260(mOP1)によって構成されている。

CBMP2 CBMP2タンパク質類をコード化しているDNA配列から発現された形態形成活性なタンパク質のグループを全体的に指し、その対立変異および種間変異、例えば、ヒトのCBMP2A("CBMP2A(x)", Seq. ID No. 9)またはヒトのCBMP2B DNA("CBMP2B(x)", Seq. ID No. 10)も含む。

DPP(x) フロソフィラのDPP遺伝子によって

コード化されており、7システインの保存骨格(Seq. ID No. 11)を構成するタンパク質配列群を指す。

Vgl(x) ゼノプスのVgl遺伝子でコード化されており、7システインの保存骨格(Seq. ID No. 12)を構成するタンパク質配列群を指す。

Vgr-1(x) ネズミのVgr-1遺伝子でコード化されており、7システインの保存骨格(Seq. ID No. 13)を構成するタンパク質配列群を指す。

GDF-1(x) ヒトのGDF-1遺伝子でコード化されており、7システインの保存骨格(Seq. ID No. 14)を構成するタンパク質配列群を指す。

OP-2タンパク質類は、このファミリーの他のタンパク質類に共通して存在する保存されたシステイン骨格に加えて、この領域にもう1つのシステイン残基を持つ(例えば、Seq. ID No. 7および8の残基41を参照)。GDF-1タンパク質は、保存骨格の中に、4つのアミノ酸からなる挿入部を持つ(Seq. ID No. 14の残基44-47)。しかしこの挿入部は、折りたたまった構造の中のシステインの関係には影響を及ぼさないように見える。さらに、CBMP2タンパク質類には、システイン骨格中の1つのアミノ酸残基が欠

けている。

これらのモルフォゲン類は、還元されたときは不活性であるが、酸化された同一二量体のときおよび本発明の他のモルフォゲン類と組み合わせると酸化されたときは活性である。すなわち、ここに説明しているように、本発明のモルフォゲンは、一対のポリペプチド鎖からなる二量体のタンパク質であり、各ポリペプチド鎖は、少なくとも、Seq. ID No. 5のアミノ酸残基43-139によって構成されるC-末端の6システイン骨格—これらのシステインの機能的に同等な配列(例えば、配列中のシステインの直線配列は変えるが、折りたたまった構造中でのシステインの関係は変えないようなアミノ酸の付加や欠落があるもの)を含む—を持つ。そのため、これらのポリペプチド鎖が折りたたまったとき、このポリペプチド鎖の対からなる二量体タンパク質類は、ここで説明されているようなモルフォゲンの働きをすることができる特有の領域または領域間のジスルフィド結合を含む、特有の3次元構造をとる。具体的には、このタンパク質は、形態形成を許容する環境において、次のような生物学的作用： 始原細胞の増殖を刺激すること、始原細胞の分化を刺激すること、分化した細胞の増殖を刺激すること、および分化した細胞の成長と維持を支援すること、さらにはこれらの細胞の再分化も含む、のすべてが可能である。さらに本発明のモルフォゲンは、適当な環境条件のもとで、分化した細胞の脱分化を誘導できるであろうことも期待される。

1つの好ましい面においては、本発明のモルフォゲン類は、各Xaaが20の天然のL-異性体のα-アミノ酸類の1つまたはそれらの1つの誘導体を指す、包括的に表示した2種類のアミノ酸配列：一般配列1(Seq. ID No. 1)または一般配列2(Seq. ID No. 2)の1つを含む。一般配列1は、6システインの保存骨格を含み、一般配列2は6システインの保存骨格に加えてOP-2で確認されている追加のシステインを含む(Seq. ID No. 2の残基36参照)。もう1つの好ましい面においては、これらの配列はさらに、それらのN-末端に次の追加の配列を含む。

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa (Seq. ID No. 15)

1 5

上記の一般配列のうちの好ましいアミノ酸配列には、一般配列3(Seq. ID No. 3)および一般配列4(Seq. ID No. 4)が含まれる。これらの一般配列は、現在までに確認されているこのモルフォゲンファミリーの多数の好ましいメンバーの間に共通する相同性(表2参照)と、それらのメンバーの間のアミノ酸配列の変異を収容している。一般配列3と4は、表2に示されておりまたSeq. ID No. 5-14で決められているタンパク質の複合アミノ酸配列である。これらの一般配列3と4は、表2の配列部が共通に持つアミノ酸配列の同一部と、その配列内の変更可能な位置にたいして

選択し得る残基の両方を示している。これらの一般配列は、一般配列3の位置41または一般配列の位置46に、分子間または分子内のジスルフィド結合が可能な特有のシステイン骨格を提供しながら、もう1つのシステインを含むことができること、およびこのタンパク質の三次構造に影響を及ぼす幾つかの重要なアミノ酸群を含んでいることに注目されたい。

一般配列3

```

Leu Tyr Val Xaa Phe
1           5
Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa
10
Xaa Ala Pro Xaa Gly Xaa Xaa Ala
15           20
Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa
25           30
Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35
Xaa Xaa Xaa Asn His Ala Xaa Xaa
40           45
Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
55           60

```

Xaa res.23-(Tyr, Asn または Phe);
Xaa res.26-(Glu, His, Tyr, Asp または Gln);
Xaa res.28-(Glu, Lys, Asp または Gln);
Xaa res.30-(Ala, Ser, Pro または Gln);
Xaa res.31-(Phe, Leu または Tyr);
Xaa res.33-(Leu または Val);
Xaa res.34-(Asn, Asp, Ala または Thr);
Xaa res.35-(Ser, Asp, Glu, Leu または Ala);
Xaa res.36-(Tyr, Cys, His, Ser または Ile);
Xaa res.37-(Met, Phe, Gly または Leu);
Xaa res.38-(Asn または Ser);
Xaa res.39-(Ala, Ser または Gly);
Xaa res.40-(Thr, Leu または Ser);
Xaa res.44-(Ile または Val);
Xaa res.45-(Val または Leu);
Xaa res.46-(Gln または Arg);
Xaa res.47-(Thr, Ala または Ser);
Xaa res.49-(Val または Met);
Xaa res.50-(His または Asn);
Xaa res.51-(Phe, Leu, Asn, Ser, Ala または Val);
Xaa res.52-(Ile, Met, Asn, Ala または Val);
Xaa res.53-(Asn, Lys, Ala または Glu);
Xaa res.54-(Pro または Ser);
Xaa res.55-(Glu, Asp, Asn または Gly);
Xaa res.56-(Thr, Ala, Val, Lys, Asp, Tyr, Ser
または Ala);

```

Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
95
Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
70           75
Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa
80
Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa
85           90
Xaa Cys Gly Cys Xaa
95

```

ただし、Xaa は次のように決められた1または複数の指定されたアミノ酸から独立に選ばれる。"res."は"残基"を示す。

Xaa res.4-(Ser, Asp または Glu);
Xaa res.6-(Arg, Gln, Ser または Lys);
Xaa res.7-(Asp または Glu);
Xaa res.8-(Leu または Val);
Xaa res.11-(Gln, Leu, Asp, His または Asn);
Xaa res.12-(Asp, Arg または Asn);
Xaa res.14-(Ile または Val);
Xaa res.15-(Ile または Val);
Xaa res.18-(Glu, Gln, Leu, Lys, Pro または Arg);
Xaa res.20-(Tyr または Phe);
Xaa res.21-(Ala, Ser, Asp, Met, His, Leu または
Gln);

Xaa res.37-(Val, Ala または Ile);
Xaa res.58-(Pro または Asp);
Xaa res.59-(Lys または Leu);
Xaa res.60-(Pro または Ala);
Xaa res.63-(Ala または Val);
Xaa res.65-(Thr または Ala);
Xaa res.66-(Gln, Lys, Arg または Glu);
Xaa res.67-(Leu, Met または Val);
Xaa res.68-(Asn, Ser または Asp);
Xaa res.69-(Ala, Pro または Ser);
Xaa res.70-(Ile, Thr または Val);
Xaa res.71-(Ser または Ala);
Xaa res.72-(Val または Met);
Xaa res.74-(Tyr または Phe);
Xaa res.75-(Phe, Tyr または Leu);
Xaa res.76-(Asp または Asn);
Xaa res.77-(Asp, Glu, Asn または Ser);
Xaa res.78-(Ser, Gln, Asn または Tyr);
Xaa res.79-(Ser, Asn, Asp または Glu);
Xaa res.80-(Asn, Thr または Lys);
Xaa res.82-(Ile または Val);
Xaa res.84-(Lys または Arg);
Xaa res.85-(Lys, Asn, Gln または His);
Xaa res.86-(Tyr または His);
Xaa res.87-(Arg, Gln または Glu);
Xaa res.88-(Asn, Glu または Asp);

Xaa res.90-(Val, Thr または Ala);
 Xaa res.92-(Arg, Lys, Val, Asp または Glu);
 Xaa res.93-(Ala, Gly または Glu);
 および Xaa res.97-(His または Arg)

また一般配列 4 は、

一般配列 4

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Tyr Val Xaa Phe	
1	5 10
Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa	
	15
Xaa Ala Pro Xaa Gly Xaa Xaa Ala	
20	25
Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa	
	30 35
Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa	
	40
Xaa Xaa Xaa Asn His Ala Xaa Xaa	
	45 50
Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa	
	55
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys	
	60 65
Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa	

Xaa res.25-(Tyr または Phe);
 Xaa res.26-(Ala, Ser, Asp, Met, His, Leu または Gln);
 Xaa res.28-(Tyr, Asn または Phe);
 Xaa res.31-(Glu, His, Tyr, Asp または Glu);
 Xaa res.33-Glu, Lys, Asp または Glu);
 Xaa res.35-(Ala, Ser または Pro);
 Xaa res.36-(Phe, Leu または Tyr);
 Xaa res.38-(Leu または Val);
 Xaa res.39-(Asn, Asp, Ala または Thr);
 Xaa res.40-(Ser, Asp, Glu, Leu または Ala);
 Xaa res.41-(Tyr, Cys, His, Ser または Ile);
 Xaa res.42-(Met, Phe, Gly または Leu);
 Xaa res.44-(Ala, Ser または Gly);
 Xaa res.45-(Thr, Leu または Ser);
 Xaa res.49-(Ile または Val);
 Xaa res.50-(Val または Leu);
 Xaa res.51-(Glu または Arg);
 Xaa res.52-(Thr, Ala または Ser);
 Xaa res.54-(Val または Met);
 Xaa res.55-(His または Asn);
 Xaa res.56-(Phe, Leu, Asn, Ser, Ala または Val);
 Xaa res.57-(Ile, Met, Asn, Ala または Val);
 Xaa res.58-(Asp, Lys, Ala または Glu);
 Xaa res.59-(Pro または Ser);
 Xaa res.60-(Glu, Asp または Gly);

	70
Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa	
75	80
Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa	
	85
Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa	
90	95
Xaa Cys Gly Cys Xaa	
	100

ただし、Xaa は次のように決められた 1 または複数の指定されたアミノ酸から独立に選ばれる。“res.” は“残基”を示す。

Xaa res.2-(Lys または Arg);
 Xaa res.3-(Lys または Arg);
 Xaa res.4-(His または Arg);
 Xaa res.5-(Glu, Ser, His, Gly, Arg または Pro);
 Xaa res.9-(Ser, Asp または Glu);
 Xaa res.11-(Arg, Glu, Ser または Lys);
 Xaa res.12-(Asp または Glu);
 Xaa res.13-(Leu または Val);
 Xaa res.16-(Glu, Leu, Asp, His または Asn);
 Xaa res.17-(Asp, Arg または Asn);
 Xaa res.19-(Ile または Val);
 Xaa res.20-(Ile または Val);
 Xaa res.23-(Glu, Gln, Leu, Lys, Pro または Arg);

Xaa res.61-(Thr, Ala, Val, Lys, Asp, Tyr, Ser または Ala);
 Xaa res.62-(Val, Ala または Ile);
 Xaa res.63-(Pro または Asp);
 Xaa res.64-(Lys または Leu);
 Xaa res.65-(Pro または Ala);
 Xaa res.68-(Ala または Val);
 Xaa res.70-(Thr または Ala);
 Xaa res.71-(Gln, Lys, Arg または Glu);
 Xaa res.72-(Leu, Met または Val);
 Xaa res.73-(Asn, Ser または Asp);
 Xaa res.74-(Ala, Pro または Ser);
 Xaa res.75-(Ile, Thr または Val);
 Xaa res.76-(Ser または Ala);
 Xaa res.77-(Val または Met);
 Xaa res.79-(Tyr または Phe);
 Xaa res.80-(Phe, Tyr または Leu);
 Xaa res.81-(Asp または Asn);
 Xaa res.82-(Asp, Glu, Asn または Ser);
 Xaa res.83-(Ser, Gln, Asn または Tyr);
 Xaa res.84-(Ser, Asn, Asp または Glu);
 Xaa res.85-(Asn, Thr または Lys);
 Xaa res.87-(Ile または Val);
 Xaa res.89-(Lys または Arg);
 Xaa res.90-(Lys, Asn, Gln または His);
 Xaa res.91-(Tyr または His);

Xaa res.92-(Arg, Glu または Glu);
 Xaa res.93-(Asn, Glu または Asp);
 Xaa res.95-(Val, Thr または Ala);
 Xaa res.97-(Arg, Lys, Val, Asp または Glu);
 Xaa res.98-(Ala, Gly または Glu);
 および Xaa res.102-(His または Arg)。

本発明においてモルフォゲンとして使用するのに特に有効な配列群は、少なくとも6または7システインの保存骨格を含むC-末端領域、例えばVgl, Vgr-1, DPP, OP-1, OP-2, CBMP-2A, CBMP-2BおよびGDF-1のC-末端の36-102のアミノ酸残基(下記の表2およびSeq. ID No. 5-14参照)、を含むものである。さらに一般配列から設計された生合成による構造、例えばCOP-1, 3-5, 7, 15(下記の表3参照)もまた有効である。他の配列群は、C-末端にCBMP3およびインヒビリン/アクチビンタンパク質(例えば米国特許No. 4, 968, 590および5, 011, 691参照)を含む。したがって、他の有効な配列群は、上記の配列群のどれかと、少なくとも70%のアミノ酸配列の相同性、好ましくは90%の相同性があるものである。これらの配列には、対立異形および変異形および突然変異形、生合成によるムテイン類、およびこの形態形成タンパク質のファミリーの新しいメンバーなどが含まれることが期待される。この組織のタンパク質のファミリーのなかでは、形態形成

中のこれらのシステインの関係を乱して機能を失わせるものでなければ含まれる。また、活性があると考えられる(下記参照)。したがって、このような活性のある形は、ここに開示された明細に記述された構造と同等のものであると見なされる。これらのタンパク質類には、異なるグリコシル化パターンを持つ形、異なるN-末端を持つ形、アミノ酸配列が相同な領域を持つ類似タンパク質のファミリー、および天然のタンパク質またはホスト細胞内で組換えDNAの発現によって作られた生合成タンパク質の端が切り取られたまたは変異した形であって活性なものも含まれる。

この形態形成タンパク質類は、完全なまたは端が切り取られたcDNAから、または原核または真核のホスト細胞内で合成DNAから発現させ、精製し、切断し、再び折りたたませ、二量体重合させることにより、形態形成にたいして活性な構造を形成させることもできる。現在好まれているホスト細胞群には、大腸菌またはCHO, COS, BSC細胞のような哺乳動物の細胞が含まれる。

したがって、この開示を参考にして、熟練した遺伝子工芸技術者は、cDNAからまたは適宜なアミノ酸配列を暗号化している多数の異なる種のゲノムライブラリから遺伝子を単離するか、またはオリゴヌクレオチド鎖からDNAを合成して、それらを原核および真核の両方を含むいろいろな種類のホスト細胞内で発現させて、ヒトを含む多量の哺乳動物の体内で組織特異的な細胞の分化お

活性を示し、かつ好ましい配列からのアミノ酸の置換が保存的な置換を含むタンパク質類、例えば、Dayoff 他によって、Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-362 (M. O. Dayoff編、Nat'l BioMed. Research Fdn., Washington, D. C. 1979)に説明されているようなタンパク質類が、特に注目される。

本発明におけるモルフォゲンとして有効な、現在最も好ましいタンパク質配列群には、hOP1の6システインの保存骨格を構成するアミノ酸の配列(例えば、Seq. ID No. 5の残基43-139)と60%より大きい、好ましくは65%より大きい同一性を持つタンパク質配列が含まれる。これらの最も好ましい配列群には、OP1およびOP2タンパク質の対立異形および変異形も含まれる。

本発明はどのように、天然に存在するソースから単離されたものであるか、組換えDNA技術によって作られたものであるかによらず、上記したポリペプチド鎖のどれかを含むタンパク質類を提供する。またこれらのタンパク質類の対立異形および変異形、天然に発生するまたは生合成された変異形、および端が切り取られたまたは合着した多数の構造も含む。欠落または付加による変異形—保存されたC-末端のシステイン骨格を変えるかもしれない変異形も、その置換が折りたたまった構造

および組織の形態形成を誘導することができる活性なタンパク質類を大量に生産することができる。

本発明はしたがってさらに、本発明の形態形成タンパク質類を用いて組織特異的な形態形成を誘導するこれらの方法、および本発明のモルフォゲン類を含む薬品および治療薬も含む。本発明はさらに、組織の成長を誘導するための処置、胎原細胞の増殖を誘導するための処置、新生物の成長を抑制するための処置、および分化した細胞の表現型細胞発現を促進するための処置を含む、いろいろな医療処置のための医薬品の製造にこれらのモルフォゲンを使用することも含む。

図面の簡単な説明

本発明それ自体、および本発明の前述した目的やその他の目的および特徴は、添付の図面と一緒に読むとき、以下の説明図からより良く理解されるであろう。

図1は、成熟マウスのいろいろな組織におけるVgr-1特異的な転写体を同定するNorthern Blot法による組織特異性である。

図2は、2週齢のマウス群から用意されたいろいろなマウスの組織(パネルA)および5週齢のマウス群から用意されたいろいろなマウスの組織(パネルB)におけるmOP-1特異的なmRNAの発現を確認するNorthern Blot法による組織特異性である。

図3は、(1)17日胎児群および(2)出生後3日のマウス群におけるB²-Tu(A、対照)、mOP-

1 (B, D)、および *Vgr-1* (C) の mRNA の発現を確認する Northern Blot 法による顕微鏡写真である。

図4Aおよび4Bは、大腸皮質 (A) および腎臓 (B) 内の *OP-1* の存在を (免疫蛍光染色によって) 示す顕微鏡写真である。

図5Aおよび5Bは、未分化の NGC:08 細胞 (5A) を誘導して神経の形態の分化 (5B) をおこさせることができるモルフェゲン (*OP-1*) の能力を示す顕微鏡写真である。

図6A-6Dは、ヒトの胎児の基底細胞の再分化にたいするモルフェゲン (*OP-1*) の効果を示す顕微鏡写真である。

図7は、部分的に肝臓を切除したラット肝にたいする食塩加リン酸緩衝液 (PBS、動物1) またはモルフェゲン (*OP-1*、動物2) の効果を示す顕微鏡写真である。

図8A-8Cは、象牙質の再生にたいする無治療 (8A)、キャリアーマトリックス治療 (8B) およびモルフェゲン治療 (*OP-1*、8C) の効果を示す顕微鏡写真である。

発明の開示

哺乳動物の骨からの粗タンパク質抽出物の中に存在する骨形成 (骨を誘導する) タンパク質の単離を可能にする精製手順が、最初に開発された (PCT US 89

参照。それらの開示は、参照によりここの組み入れられている。)

ウシの材料から得られた配列データはまた、骨形成に役割を果たしていることが知られていなかったこの分野において既知の多数のタンパク質との大きな相同性を示唆した。これらのタンパク質を用いた骨形成の実験は、これらのタンパク質類を適当なマトリックスと一緒に哺乳動物に入れたとき、軟骨および軟骨内の骨の形成が誘導されることを示した (例えば、米国特許 No. 5, 011, 691 参照)。これらのタンパク質類のうちの1つは、骨-膜の分化に役割を果たすことが知られておりかつ成虫芽の正しい形態形成に必要とされるドロソフィラのタンパク質 DPP である。他の2つのタンパク質は、ゼノプスおよびマウスにおいて確認された類似の配列 (それぞれ *Vgl* および *Vgr-1*) であり、胚形成期の成長と分化の制御に役割を果たすと考えられている。DPP および *Vgr-1* (または *Vgr-1* に類似物質) の転写体は、いろいろな組織 (胚、新生児および成体、Lyons 他 (1989) PNAS 86: 4554-4558、および下記参照) で確認されているが、母系遺伝かつ空間的に植物内胚葉に限定されている *Vgl* の転写体は、原腸胚形成後は劇的に減少する。

これらの相同性から、マトリックスと一緒に入れられたとき哺乳動物内で骨の形態形成を誘導するために必要な活性な配列を含む、包括的な共通の配列が導き出された。この一般配列は、少なくとも、保存された5システ

／01453 および米国特許 4, 968, 590 参照)。この方法の開発は、新鮮な子ウシの骨が入手可能であることと結びついて、実質的に滅菌なウシの骨形成タンパク質 (BOP) の単離を可能にした。BOP はその基本事項が調べられ、次にネコ、ウサギ、ラットにおいて軟骨そして最終的に軟骨内の骨の成長を誘導する能力があることが示され、研究された。さらに、それ以前には異成分から成る骨抽出物の中の未知の1つまたは複数のタンパク質によるものと考えられていた骨の形成の全発達段階を誘導できることが示された。さらにこの用量に依存しかつ非常に特異性のある活性は、このタンパク質がグリコシル化されているかいないかによらず存在した (米国特許 No. 4, 968, 958、1988年8月4日出願および Sampath 他 (1990) J. Biol. Chem. 265: pp. 13198-13205 参照)。ウシの材料から得られた配列のデータは、異なる種から得られた骨形成タンパク質類を遺伝暗号化している遺伝子群を単離するために使用されたプロンプのデザインに示唆を与えた。ヒトおよびネズミの骨形成タンパク質の同種物は、すでに確認された基本項目が調べられた (例えば、米国特許 No. 5, 011, 691、Ozkaynak 他 (1990) EMBO J 9: 2085-2093、および Ozkaynak 他 (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 179: 116-123、および USSN 341, 646、1992年2月21日出願を

インの骨格 (一般配列 1、Seq. ID No. 1)、または任意の7システイン骨格 (一般配列 2、Seq. ID No. 2) を持つ。この7システイン骨格は、一般配列 1 で決められる6システインの保存骨格と、残基36の位置のもう1つのシステインを含み、OP2タンパク質類において確認されている付加的なシステイン残基を収容する。一般配列の中の各 "Xaa" は、その位置に、天然の20のL-異性体の α -アミノ酸の1つまたはその1つの誘導体を入れてもよいことを示す。もっと長いやはり有効な一般配列は、さらに、それらのN-末端に次の配列を含む。

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa (Seq. ID No. 15)

1

5

この包括的な共通の配列から設計され生合成された構造も、軟骨および/または軟骨内の骨形成を誘導することが示されている (例えば、米国特許 No. 5, 011, 691 に記載されており、かつ下記の表3に示した COP-1、COCOP-3、COP-4、COP-5、COP-7 および COP-16)。下記の表2は、モルフェゲンとして確認されている天然のタンパク質類の活性領域のアミノ酸配列を比較している。このようなタンパク質には、ヒト *OP-1* (hOP-1、Seq. ID No. 5 および 16-17)、マウス *OP-1* (mOP-1、Seq. ID No. 5 および 18-19)、

表 2

ヒトおよびマウスOP-2 (Seq. ID No. 7, 8 および 20-22)、CBMP2A (Seq. ID No. 9)、CBMP2B (Seq. ID No. 10)、DPP (ドロソフィラ由来, Seq. ID No. 11)、Vgl (ゼノプス由来, Seq. ID No. 12)、Vgr-1 (マウス由来, Seq. ID No. 13) および GDF-1 (Seq. ID No. 14) が含まれる。この表の中の3つのドットは、その位置のアミノ酸が、hOP-1のアミノ酸と同じであることを示している。3つのダッシュは、その位置にはアミノ酸が存在しないことを示しており、相同性を明らかにする目的で入れてある。例えば、CBMP-2AおよびCBMP-2Bの残基60の位置のアミノ酸は欠落している。もちろん、これらの2つのアミノ酸配列は、この領域において、Asn-Ser (残基58、59)の次に、CBMP-2AはLysおよびIleを含み、CBMP-2BはSerおよびIleを含む。

hOP-1	Cys	Lys	Lys	His	Glu	Leu	Tyr	Val	
hOP-1	
hOP-2	...	Arg	Arg	
hOP-2	...	Arg	Arg	
DPP	...	Arg	Arg	...	Ser	
Vgl	Lys	Arg	His	
Vgr-1	Gly	
CBMP-2A	Arg	...	Pro	
CBMP-2B	...	Arg	Arg	...	Ser	
GDF-1	...	Arg	Ala	Arg	Arg	
	1				5				
hOP-1	Ser	Phe	Arg	Asp	Leu	Gly	Tyr	Gln	Asp
hOP-1
hOP-2	Gln	Leu	...
hOP-2	Ser	Leu	...
DPP	Asp	...	Ser	...	Val	Asp	...
Vgl	Glu	...	Lys	...	Val	Asn
Vgr-1	Gln	...	Val
CBMP-2A	Asp	...	Ser	...	Val	Asn	...
CBMP-2B	Asp	...	Ser	...	Val	Asn	...
GDF-1	Gln	Val	His	Arg
		10						15	
hOP-1	Irp	Ile	Ile	Ala	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ala
hOP-1
hOP-2	...	Val	Glu	Ser
hOP-2	...	Val	Gln	Ser
DPP	Val	Leu	Asp
Vgl	...	Val	Gln	Met
Vgr-1	Lys
CBMP-2A	Val	Pro	His
CBMP-2B	Val	Pro	Gln
GDF-1	...	Val	Arg	...	Phe	Leu
		20						25	
hOP-1	Ala	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly	Glu	Cys	Ala
hOP-1
hOP-2	Ser
hOP-2
DPP	His	...	Lys	...	Pro
Vgl	...	Asn	Tyr	Pro
Vgr-1	...	Asn	Asp	Ser
CBMP-2A	...	Phe	His	...	Glu	...	Pro
CBMP-2B	...	Phe	His	...	Asp	...	Pro
GDF-1	...	Asn	Gln	...	Gln
			30					35	
hOP-1	Phe	Pro	Leu	Asn	Ser	Tyr	Met	Asn	Ala
hOP-1
hOP-2	...	His	Leu	Met	Lys	Asn	Ala
hOP-2	...	His	Leu	Met	Lys	Asp	Val
hOP-2	...	His	Leu	Met	Lys	Asp	Val
hOP-2	...	His	Leu	Met	Lys	Asp	Val

特表平6-506360 (14)

DPP	...	Asa	Asn	Asn	...	Gly	Lys	...
Val	Ser	...	Glu	...	Asp	Ile
Var-1	Val	Met	Tyr	...
CBMP-2A	...	Asa	Ser	Val	...	Ser	Lys	Ile
CBMP-2B	...	Asa	Ser	Val	...	Ser	Ser	Ile
GDP-1	Met	...	Ala	Ala	Ala	...	Gly	Ala
		55					60	

hOP-1	Pro	Lys	Pro	Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Glu
mOP-1
hOP-2	Ala	Lys
mOP-2	Ala	Lys
DPP	Ala	Val
Val	...	Leu	Val	Lys
Var-1	Lys
CBMP-2A	Ala	Val	Glu
CBMP-2B	Ala	Val	Glu
GDP-1	Asp	Leu	Val	...	Ala	Arg
		55						70	

hOP-1	Leu	Asn	Ala	Ile	Ser	Val	Leu	Tyr	Phe
mOP-1
hOP-2	...	Ser	...	Thr	Tyr
mOP-2	...	Ser	...	Thr	Tyr
Val	Met	Ser	Pro	Met	...	Phe	Tyr
Var-1	Val

CBMP-2B	Asn	...	Gln	Glu	Glu
GDP-1	Gln	...	Glu	Asp	Asp
		90						95

hOP-1	Ala	Cys	Gly	Cys	His
mOP-1
hOP-2
mOP-2
DPP	Gly	Arg
Val	Glu	Arg
Var-1
CBMP-2A	Gly	Arg
CBMP-2B	Gly	Arg
GDP-1	Glu	Arg
		100			

● GDP-1 の残基 43 と 44 の間には、アミノ酸配列 Gly-Gly-Pro-Pro が入っている。

下記の表 3 は、COP 1, 3, 4, 5, 7, 16 と名づけた 6 つの類似の生合成された構造のアミノ酸配列のデータの比較を示す。これらの配列はまた、米国特許 No. 5, 011, 691 にも記載されている。表 2 におけるのと同じように、ドットはその位置に COP-1 のアミノ酸と同じアミノ酸があることを示し、ダッシュは COP-1 のアミノ酸がその位置では欠落していることを示す。

DPP	...	Asp	Ser	Val	Ala	Met	Leu
CBMP-2A	...	Ser	Met	Leu
CBMP-2B	...	Ser	Met	Leu
GDP-1	...	Ser	Pro	Phe	...
				75					80

hOP-1	Asp	Asp	Ser	Ser	Asn	V
al	Ile	Leu	Lys			
mOP-1
hOP-2	...	Ser	...	Asn
mOP-2	...	Ser	...	Asn
DPP	Asn	...	Glu	...	Thr	...
Val	...	Asn	Asn	Asp
Var-1	Asn
CBMP-2A	...	Glu	Asn	Glu	Lys	...
CBMP-2B	...	Glu	Tyr	Asp	Lys	...
GDP-1	...	Asn	...	Asp
						85

hOP-1	Lys	Tyr	Arg	Asn	Met	Val	Val	Arg
mOP-1
hOP-2	...	His	Lys
mOP-2	...	His	Lys
DPP	Asn	...	Gln	Glu	...	Thr	...	Val
Val	His	...	Glu	Ala	...	Asp
Var-1
CBMP-2A	Asn	...	Gln	Asp	Glu

表 3

COP-1	Leu	Tyr	Val	Asp	Phe	Gln	Arg	Asp	Val
COP-3
COP-4	Ser
COP-5	Ser
COP-7	Ser
COP-16	Ser
	1					5			

COP-1	Gly	Trp	Asp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala
COP-3	Val	...
COP-4	Val	...
COP-5	Val	...
COP-7	Asn	Val	...
COP-16	Asn	Val	...
	10						15	

COP-1	Pro	Val	Asp	Phe	Asp	Ala	Tyr	Tyr
COP-3	...	Pro	Gly	Tyr	Glu	...	Phe	...
COP-4	...	Pro	Gly	Tyr	Gln	...	Phe	...
COP-5	...	Pro	Gly	Tyr	Gln	...	Phe	...
COP-7	...	Pro	Gly	Tyr	His	...	Phe	...
COP-15	...	Pro	Gly	Tyr	Glu	...	Phe	...
						20		25

特表平6-506360 (15)

COP-1 Cys Ser Gly Ala Cys Glu Phe Pro
COP-3
COP-4
COP-5 ... His ... Glu ... Pro ...
COP-7 ... His ... Glu ... Pro ...
COP-16 ... His ... Glu ... Pro ...

30

COP-1 Ser Ala Asp His Phe Asn Ser Thr
COP-3
COP-4
COP-5 Leu
COP-7 Leu
COP-16 Leu

35

40

COP-1 Asn His Ala Val Val Glu Thr Leu Val
COP-3
COP-4
COP-5
COP-7
COP-16

45

50

COP-1 Asn Asn Met Asn Pro Gly Lys Val
COP-3

COP-7 Glu Lys ...
COP-16 Glu Lys ...
75 80

COP-1 Val Leu Lys Asn Tyr Glu
s Glu Met
COP-3
COP-4
COP-5
COP-7
COP-16

85

90

COP-1 Thr Val Val Gly Cys Glu
r Cys Arg
COP-3 Val ... Glu ...
COP-4 Val ... Glu ...
COP-5 Val ... Glu ...
COP-7 Val ... Glu ...
COP-16 Val ... Glu ...

95

COP-4
COP-5 ... Ser Val ... Ser Lys Ile ...
COP-7 ... Ser Val ... Ser Lys Ile ...
COP-16 ... Ser Val ... Ser Lys Ile ...

55

COP-1 Pro Lys Pro Cys Cys Val Pro Thr
COP-3
COP-4
COP-5
COP-7
COP-16

60

65

COP-1 Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu
COP-3
COP-4
COP-5
COP-7
COP-16

70

COP-1 Tyr Leu Asp Glu Asn Ser Thr Val
COP-3 Glu Lys ...
COP-4 Glu Lys ...
COP-5 Glu Lys ...

前述のアミノ酸配列の比較から明らかなように、モルフェゲン特性を保持しながら、これらの一般配列の内部でかなりのアミノ酸の変更が可能である。例えば、表2に図示されているGDF-1タンパク質の配列は、同図に示されているhOP1の配列と、約50%のアミノ酸しか同じでないが、GDF-1の配列は、hOP1配列と、70%よりも大きいアミノ酸配列の相同性を持つ。ここで、相同性は、Atlas of protein Sequence and Structure; vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-362 (M. O. Dayoff, ed., Nat'l Bio Med. Res. Fed'n, Washington, D. C. 1979)においてDayoff 他によって定義されているように、その配列内で許容される保守的なアミノ酸の変更であると定義する。

これらの配列によって示されるタンパク質のファミリーはまた、骨および軟骨以外の組織においても、組織特異な多段階発生を開始させ維持することができることが発見されている。ここに開示したような未分化の地原細胞と組み合わせると、モルフェゲンと名づけたこれらのタンパク質は、その地原細胞の増殖と分化を誘導することができる。これらの細胞の分化を方向づける適切な組織特異な信号が存在し、かつ形態形成を許容する環境において、これらのモルフェゲンは、胚の発生期に起こる多段階の細胞および分子事象を再現して、機能組織を生じさせることができる。

これらの発現のかぎは、哺乳動物の組織のモデルシステム、すなわち軟骨内の骨形成にたいするモデルシステムの創出と、骨の組織の形態形成のために重要な多段階の事象の研究であった。このシステムを使った研究は、骨を誘導するモルフォゲン類だけでなく、組織を誘導するモルフォゲン類とそれらの活性の発現を可能にした。骨のモデルシステムを開発するために使われた方法は、現在ではこの分野においてよく知られているが、本発明のタンパク質類と組み合わせると、他の組織、例えば肝臓のためのモデルシステムを作り出すために使用できる(下記参照)。

軟骨内の骨形成のモデルシステムを使って、組織の形態形成にたいしては、形態形成する材料が置かれる局所的な環境が重要であることも発見されている。ここでの使用では、“局所環境”は、組織の構造マトリックスとその組織をとりまく環境を含むと解釈される。例えば、モルフォゲンにより刺激された細胞は、それらの増殖のために適当な固着基台を必要とするだけでなく、それらの分化の組織特異性を指示するための信号類を必要とする。これらの信号は異なる組織にたいしては異なっており、細胞の表面の環境も含まれる。さらに、新しい組織の血管形成は、血管形成を支持する局所環境を必要とする。例として骨のモデルシステムを使うことにより、標準的な試験条件下では、骨誘導性のモルフォゲン類を組織の特異性を指定するマトリックスが存在しない、バラバラの間充細胞に入ると、非常に高濃度のタンパク質を

入れないかぎり、普通には軟骨内骨形成はおこらない。対照的に、比較的低濃度のモルフォゲンを適正に修飾された骨由来のマトリックスと一緒に入れると、完全に機能する軟骨内骨が形成される(例えば、Sampath 他 (1981) PNAS 78: 7599-7603 および米国特許No. 4,975,526 参照)。さらに、組織特異なコラーゲンのような構造ポリマーと、組織特異なグリコシルアミノグリカンのような組織特異の細胞付着因子群とから構成された合成マトリックスは、軟骨内の骨形成を可能にするであろう(例えば、PCT 公報 US91/03603, 1991年12月12日発行(WO91/18558) — 参照によりここに組み入れられている 参照)。最後に、モルフォゲンと骨または軟骨にたいして特異性のある適当なマトリックス(例えば、タイプ1軟骨を含むもの)と一緒にバラバラの間充細胞に移植すると、軟骨および軟骨内骨形成がおこり、血管および血管システムまで形成される。しかしながら、同じ組成を血管を含まない環境、例えば試験管内の培養細胞群や軟骨に特異な部位に置くと、組織の発達は軟骨の形成から先へは続かない(下記参照)。同様に、タイプ2のコラーゲンから構成される軟骨特異なマトリックスを含むモルフォゲン組成物は、生体内で非軟骨組織(例えば、ヒアルン)の形成を誘導することが期待される。しかしながら、この組成物を血管を支持している環境例えばバラバラの間充細胞に置くと、この組成物は、増殖しつつある始原細胞群を誘導して軟骨細胞および造

骨細胞へ分化させ、最終的には骨を形成させることができる。

また組織の形態形成は、形態形成を許容する環境を必要とすることも発見されている。明らかに、一生の間再生を続ける細胞集団から構成されていない、完全に機能している健康な組織では、継続的な組織の成長を阻止する信号類が存在するはずである。したがって、細胞の成長や分化を制御する、フィードバック制御機構のような、制御機構が存在するにちがいないと考えられている。実際、TGF- β およびMISは、両方とも、適当な濃度で存在するとき、細胞の成長を阻止することができることが知られている。さらに、骨のモデルシステムを使って、脱灰しさらにグアニジン抽出して実質的に完全に非コラーゲン タンパク質類を除いた骨由来のキャリア(マトリックス)を含む骨形成デバイス、骨誘導性のモルフォゲンと一緒に移植すると、軟骨内骨形成を許すことを示すことができる。しかしながら、骨由来のキャリアを脱灰せず、例えば低濃度の塩の中で洗浄するだけにとすると、軟骨内の骨形成の誘導は抑制される。このことは、そのキャリアの中に、1つまたは複数の抑制因子があることを示唆している。

これらの発現のもう1つのかぎは、発達しつつある組織および成体組織におけるこれらのモルフォゲン類の広範な分布の決定であった。例えば、OPPは胚胎および発達しつつあるドロソフィラの組織で発現されている。Vgr-1の転写体は、ゼノプスの胚胎の組織の中に確認さ

れている。Vgr-1の転写体は、胚胎および発達しつつある脳、肺、肝臓、腎臓および頭蓋冠(皮膚骨)の組織を含むネズミのいろいろな組織で確認されている。近年、Vgr-1転写体は、成長したネズミの肺、腎臓、心臓および脳でも確認され、特に肺の中に多いことが確認された(下記参照)。

OP-1およびCBMP2タンパク質は、最初は骨モルフォゲン類として確認されたものであり、組織から作成されたcDNAライブラリの中のOP-1およびCBMP2に特異な配列を同定することにより確認されたところによれば、マウスおよびヒトの胎盤、腸胃、頭蓋冠および骨肉腫の組織中に確認されている(Oskaynak 他(1990)EMBO J 9:2085-2093およびOskaynak 他(1991)Biochem. Biophys. Res. Commun. 179:116-123 参照)。さらに、OP-1タンパク質は、Western Blot分析および免疫位置決定法により確認されたところによれば、腎臓、肝臓、心臓、副腎組織、脳を含む各種の胚胎期および発達期の組織の中に存在する(下記参照)。OP-1特異の転写体もまた、胚胎期および発達期の組織の両方で、そして腎臓、膀胱および脳において最も多く、確認されている(下記参照)。OP-1はまた、胚形成期に、中葉胚を誘導する因子として存在することも確認されている(下記参照)。さらにOP-1は、付随細胞群の中でそれらと関係し、また成長したネズミの軟骨内骨の損傷の後

に骨髄中の多能幹細胞と関係することが示されたが、このことは組織の修復ならびに再生におけるOP-1の形態形成上の役割を示している。さらに近年確認されたタンパク質GDF-1(表2参照)は、神経組織の中で確認された(Lee, (1991)PNAS 884250-4254)。

例

モルフォゲンの同定と分類

本発明において役に立つタンパク質類のなかには、当初骨髄系タンパク質として確認されたタンパク質がある。例えばOP-1、OP-2、CBMP タンパク質や、アミノ酸配列が類似するDPP(ドコソフィラ由来)、Vgl(ゼノブス由来)、Vgr-1(マウス由来、表2および配列リスト参照)のようなタンパク質である。このファミリーのメンバー構造的に類似するタンパク質のTGF- β スーパーファミリーのいくつかのメンバーを含む一は、それらのC-末端領域に実質的なアミノ酸配列の相同性がある。OP-2タンパク質類は、このファミリーの他のタンパク質類と共通の保存システイン骨格に加えて、この領域に1つの余分のシステイン残基(配列表No. 1および8の位置41)を持つ。これらのタンパク質類は、還元されたときは不活性であるが、酸化された同一二量体複合体のとき、および他のモルフォゲン類と組み合わせて酸化されたときは活性である。

前述のアミノ酸およびDNA配列に関する情報、当業界の技術水準、および米国特許Nos. 4, 968, 590および5, 011, 691、PCT出願US89/01469、公開1989年10月19日(WO89/09788)、およびOzkanak 他(1990)EMBO J9:2085-2093 および Ozkanak 他(1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 179:116-123—開示内容は参照によってここに組み入れられている—が与えられているので、少なくとも本発明の1つのモルフォゲンの活性領域、その多様な類似構造(対立変異や、遺伝子工学により作られた変異形を含有する変異種も含む)、さらには融合タンパク質類、成熟タンパク質類の塩が切り取られたもの、欠落や付加による変異形、およびそれらに類似な構造、などを暗号化する多様なDNAが構成できる。さらに、DNAのハイブリッド化のためのプローブは、これらのタンパク質類のどれかを暗号化している遺伝子の断片—これらのタンパク質の活性領域またはpro領域を暗号化している配列を含むもの(下記参照)—から構成することもできるし、一般配列から新規に設計することもできる。これらのプローブは、異なるゲノムおよびcDNAライブラリをスクリーニングして、異なる組織からさらに別の形態形成タンパク質を同定するために使用できる。

このようなDNAは、この分野に習熟した者によって、ゲノムおよびcDNAの単離、合成オリゴヌクレオチド

したがって、本発明のモルフォゲン類は、各Xaaが20の天然のL-異性体の α -アミノ酸類の1つまたはそれらの1つの誘導体を指す、包括的に表示した2種類のアミノ酸配列：一般配列1または一般配列2(Seeq. ID No. 1および2)のどちらかによって記述される。このタンパク質のファミリーに入る特に有効な配列群には、Vgl、Vgr-1、DPP、OP-1、OP-2、CBMP-2A、CBMP-2B、GDF-1の95-102のC末端残基と、それらの完全な成熟アミノ酸配列群がある。さらに、これらの一般配列から設計された生合成構造、例えば、COP-1、COP-3、-5、COP-7およびCOP-16などもまた有効である(例えば、米国特許No. 5, 011, 691参照)。

現在までにモルフォゲン類として使用できることが確認されている配列から選出された好ましいアミノ酸配列を示す一般配列は、一般配列3(Seeq. ID No. 3)および一般配列4(Seeq. ID No. 4)によって記述される。これらの一般配列群は、分子間または分子内のジスルフィド結合が形成可能な7または8システインの骨格を持つこと、およびそれらのタンパク質類の三次構造に影響を及ぼす幾つかの重要なアミノ酸類を含んでいることに注目されたい。天然に存在するタンパク質類の異なるN-末端残基は、これらのタンパク質類の組織特異な、または他の重要な調節活性を与えていることも考えられている。

からの合成DNAの構成、カセット突然変異誘発技術などを含むよく知られたDNA操作技術を使って、作ることができる。Biosearchの8600型DNA合成器により15-100merのオリゴヌクレオチドを合成し、トリス-ホウ酸塩-EDTA緩衝液中でポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により精製する。この後、DNAはゲルから電気的に溶離される。オーバーラップしたオリゴマーは、T4ポリヌクレオチドキナーゼにより末端化して、PAGEによっても精製し得るより大きなブロックに結合する。

次に適正に同定されたクローンからのDNAが単離され、サブクローニングされ(好ましくは発現ベクターの中に)、そして配列決定される。対象とする配列群を含んだプラスミド群は、次に、モルフォゲンを発現させるためおよびさらに性質を調べるために、適当な宿主細胞に移入される。宿主細胞は、原核細胞でも真核細胞でもよい。なぜなら、前者はタンパク質をグリコシル化する能力がないので、そのタンパク質の形態形成活性を損なわないからである。便利な宿主細胞群としては、大腸菌、サッカロミセス、昆虫/バクテリオウイルス誘導システム、ミエローマ細胞、および多数の他の哺乳動物の細胞がある。このベクターはさらに、転写プロモーター、終止配列、エンハンサー(増強構造)、好ましいリボソーム結合部位配列、好ましいmRNAリーダー配列、タンパク質の分泌のための信号配列などを含む。組織タンパク質の正しい発現を促進するためのいろいろな配列を

含むことができる。

対象とする遺伝子を暗号化したDNA配列はまた、抑止配列であるかもしれない配列を除去するため、あるいは望ましくない二次および三次構造の形成を最小にするように操作される。この組換えモルフォゲンもまた融合タンパク質として発現される。翻訳後、タンパク質に細胞自体から修飾するか、培養液から回収される。生物学的に活性なすべてのタンパク質の形は、ジスルフィドボンドによって結合されているか、または他の方法で会合した二量体複合体を含む。これらは一つまたはそれ以上のいろいろな組換えポリペプチド鎖を、適当な宿主細胞内または試験管内で、個々のサブユニットを発現させた後に、リホルディングおよび酸化させて作られる。大腸菌および多数の異なる哺乳動物細胞の中で組換えDNAから発現されたモルフォゲンに関する詳細な記述は、PCT公開US90/05903、1991年5月2日(WO91/05802)公開および米国特許第No. 841,646、1992年2月21日出願—この開示内容は参照によりここに組み入れられている—に開示されている。

また別のやり方として、形態形成ポリペプチド鎖を、この分野において通常の技術者にもよく知られている従来のペプチド合成技術を用いて、化学的に合成することも可能である。例えば、Bioscienceの固体相ペプチド合成器で、標準的操作手順を用いて、完全なタンパク質あるいは部分的なタンパク質を合成することが

ある。完成した鎖はつぎに処理をはずされ、HPLC(高圧液体クロマトグラフィ)によって精製される。もしそのタンパク質が部分的に合成されたものであるときは、それらの部分を、標準的な手法を用いてペプチド結合させて、完全なタンパク質を形成することができる。一般的には、モルフォゲン鎖の作り方は従来の方法でよく、これは本発明の一部分を構成するものではない。

モルフォゲンの分布

本発明のモルフォゲン鎖の、生物の全生命期間を通じての一般的な機能は、全く異なる各種の哺乳動物の組織における発現から証明できる。モルフォゲン鎖の組織分布の決定もまた、与えられた組織で発現される異なるモルフォゲン鎖を同定したり、新しい、類似したモルフォゲン鎖を同定するのにも利用できる。このタンパク質鎖(あるいはそのmRNA転写体)は、標準的な手法または発現が少ない組織においてはそれを直ちに修正した方法を使って、異なる組織中において簡単に確認できる。例えば、タンパク質分布は、標準のWestern Blot分析法または免疫蛍光技術と、対象とするモルフォゲンまたはモルフォゲン鎖に特異的な抗体群を用いて、決定することができる。同じように、モルフォゲン転写体の分布は、標準のNorthernハイブリッド化プロトコルおよび転写体に特異的なプローブ群を用いて決定できる。

特異的に1つの転写体とのハイブリッド化が可能で、

対象とする転写体を他の類似する転写体から区別できるものであれば、どのようなプローブでも使用できる。本発明のモルフォゲン鎖は、それらの活性なC-末端領域に高い相関性があるので、特定のモルフォゲン転写体の組織分布は、不成熟タンパク質のpro領域および/または成熟タンパク質のN-末端領域にたいして特異的なプローブを使用すると、最もよく決定できるであろう。その使用できる配列は、停止コドンに隣接しかつそれに続く3'非翻訳領域である。配列中のこれらの部分は、本発明のモルフォゲン鎖の間で大幅に異なり、したがって各タンパク質に特有のものである。例えば、特に有効なVgr-1特異的なプローブ配列は、PvuII-SacIフラグメント、すなわち翻訳されないpro領域の1部分と成熟配列のN-末端の両方を暗号化している265bpのフラグメントである(cDNA配列の記述は、Leons 他(1989) PNAS 86:4554-4558 参照)。同様に、特に有効なmOP-1特異的なプローブ配列は、BstXI-BglIフラグメント、すなわちmOP-1のpro領域のほぼ2/3を含む0.68kbの配列: StuI-StuIフラグメントすなわち7システイン領域のすぐ上流の0.2kbの配列: およびEcoRI-PstIフラグメント、すなわち3'非翻訳配列の1部分を含む、3kbのフラグメントである(Seq. ID No. 18 参照、この配列では、pro領域は本質的に残基30-291で規定されている)。例えばhOP1(Seq. ID

No. 16)またはヒトまたはマウスのOP2(Seq. ID No. 20および22)に対しても、同様のアプローチが使用できる。

これらのモルフォゲン特異的なプローブ群—合成されたもので、クローニングされた配列から得られたものでもよい—を使うと、この分野の普通の技術を持つ人々によく知られている標準的な方法によって、哺乳動物の組織中のモルフォゲン転写体を確認できる。簡単に説明すると、成長したネズミのいろいろな組織(例えば、肝臓、腎臓、精巣、心臓、脳、腸胃および胃)から、標準的な方法、例えばChomczynski 他(1987) Anal. Biochem. 162:156-159)で、下記のようにして、全RNAを用意する。オリゴ(dT)—セルロースクロマトグラフィ(例えば、Pharmacia LKB Biotechnology社のタイプ7)を使って、ポリ(A)+RNAを用意する。各組織からのポリ(A)+RNA(通常15μg)を、1%のアガロース/ホルムアルデヒドゲル上で分別し、Nyttran膜(Schleicher & Schuell)の上に移す。移した後、そのメンブレンを80°Cで焼き、紫外光線(通常1mW/cm²で30秒間)のもとでRNAを架橋させる。ハイブリッド化の前に、適当なプローブ(例えば、PvuII-SacI Vgr-1フラグメント)を加熱して変性させる。ハイブリッド化は、ローラーボット装置内では1回転/分で回転するルーサイト製のシリンダの中で、

40%フォルムアルデヒド、5×Denhardt's、5×SSPEおよび0.1%SDSからなるハイブリッド化ミックスを使って、37°Cで約15時間行う。このハイブリッド化の後、非特異性のものは、0.1×SSPE、0.1%SDS中で50°Cでフィルタ洗浄して除かれる。成熟配列の異なるN末端にたいして特異性のあるVgr-1プローブを使って行ったNorthern Blots分析は、Vgr-1のメッセージが約3.5kbであることを示す。

図1は、Vgr-1特異のプローブを用いて、成長したネズミのいろいろな組織を、Northern Blots分析で調べた結果を表す顕微鏡写真である。レーン3-10はそれぞれ肝臓、腎臓、精巣、心臓、脳、胸腺および胃を示している。レーン1と12はサイズスタンダードであり、レーン2と11はブランクである。テストした組織の中で、Vgr-1が最も多く発現されていたのは成人の肺であり、少なかったのは成人の腎臓、心臓および脳であった。これらの結果はVgr-1およびVgr-1転写体をいくつかの成熟マウス組織で確認した以前の研究成果、(Lyonsら、(1989)PNAS 86:4554-4558)、ならびに、いろいろなヒトcDNAライブラリ群の中でOP-1およびCBMP2を確認した研究成果(例えば、胎盤、腸胃、頭蓋冠、および骨肉腫組織、Oskeynaskら、(1990)EMBO 9:2085-2093参照)を確認し発現させるものである。

に対して行われた追加の分析は示されていないが、OP-1 mRNA発現は高く、腎臓/副腎組織で検知されたレベルに近かった。Northern Blots分析によれば、GDF-1、OP-1 mRNA発現は異なった組織においても同じようにbicistronicであることも示されている。異なった組織において、4つの転写体:4kb、2.4kb、2.2kb、および1.8kbの転写体が確認され、OP-1特異のプローブを用いて、遺伝子のpro部分とN末端配列群をクロスプローブ調査した結果、これらの転写体はOP-1特異のものであることが示された。

図3のOP-1およびVgr-1の並列比較によって、これらのプローブ群が異なる組織中のモルフェゲンVgr-1とOP-1転写体を区別することがわかり、また異なる組織中のOP-1の複数の転写を浮かび上がらせることが示されている。具体的には、図3はOP-1(パネルBおよびD)、Vgr-1(パネルC)、およびEF-Tu(パネルA)(対照)胎性17日(レーン1)および生後3日(レーン2)のマウスのmRNAの発現を比較したものである。OP-1特異(パネルBおよびD)、Vgr-1特異(パネルC)、およびEF-Tu特異(パネルA)のラベル付きDNAプローブによる連続ハイブリッド化には同じフィルタが使われた。パネルA:EF-Tu特異のプローブ(対照)は0.4kbのHindIII-SacIフラグメント(タンパク質を符号する領域の一部)であり、使われたSacIサ

同じプローブ調査方法を使って、図2および3に示すように、mOP-1転写体も多くのネズミ組織の芽胞およびいろいろな成長組織の中で確認されている。プローブ調査方法の詳細はOskeynaskら、(1991)

Biochem. Biophys. Res. Comm. 179:115-123に開示されており、ここにレファレンスとして収録されている。図2に示されているNorthern Blotsは、生後13日のマウス(パネルA)または5週令のマウス(パネルB)の成長中の脳、脾臓、肺、腎臓(および副腎)、心臓、および肝臓からのRNAをプローブ調査したものを示している。このOP-1特異のプローブは上記の3'非翻訳配列群を含んだもの(0.34kb EarI-PstIフラグメント)であった。RNA回収のための対照として、EF-Tu(翻訳伝長因子)mRNA発現も測定された(EF-Tu発現はほとんどの組織で比較的均一と思われる)。

矢張り形は、個々の組織で調査されるOP-1特異のメッセージ群を示している。図2で明らかなように、OP-1発現は、脾臓、肺、腎臓および副腎組織で大幅に異なるが、これらのEF-Tu mRNAレベルは一定である。心臓、脳、および肝臓で、一様に低いEF-Tu mRNAレベルが観察された。顕微鏡写真に明らかに見られるように、最も高いレベルのOP-1 mRNAは腎臓および副腎、ついで脳に現れる。反対に、心臓および肝臓からは検知できる信号はなかった。膀胱組織

イトはベクターに属する;パネルB:OP-1特異のプローブは0.68kbのBstXI-BglIフラグメントでpro部分配列群を含むもの;パネルD:OP-1特異のプローブは0.34kbのEarI-PstIフラグメントで3'非翻訳配列群を含むもの;パネルC:Vgr-1特異のプローブは0.26kbのPvuII-SacIフラグメントで上記のVgr-1の分析で使われたものである。

1.8-2.5kbのOP-1 mRNAは、生後3日のマウスでは胎性17日のものに比べて約2倍高く発現するが、これは多分骨および/または腎臓の成長の推移を反映しているものであろう。さらに、脳で認められた4つのメッセージ群では、2.2kbの転写が最も多く現れたが、肺と脾臓では1.8kbのメッセージが支配的であった。5週令マウスの腎臓および副腎組織を注意深く分離した結果、2.2kb転写群は腎臓組織から出るが、4kb mRNAは副腎により多いことが判明した(図2参照)。

同様に、同じ一般的なプローブ調査方法を使用して、BMP3およびCBMP2転写群が肺組織に大量にあることが最近確認された。

胎性組織中のモルフェゲン分布は、5ないし8日令のマウス胎児群ならびにモルフェゲン特異の抗血清と組み合わせた標準的な免疫蛍光分析手法を用いることによって決定することができる。例えば、ウサギの抗OP-1抗血清は、当業界で広く知られている多くの標準抗体プ

ットコル類のいずれかを使用すれば簡単に得ることが出来る。次にこの抗体に標準的な手法を用いて蛍光ラベルをつける。次に、5ないし6日令のマウス胎児を凍り切片に切り分け、ラベル付けされた抗体で各種の成長組織群を再び標準的な手法に従って探査する。こうした手法を使って、成長中の脳および心臓の中にOP-1タンパク質が検出された。

この方法は修復中の成人組織群の中のモルフォゲン群を確認するのに使用できるであろう。例えば、ウサギの長骨例えば大腸骨に骨折部分を作る。2ないし3日、骨折が治るように放置しておく。その後、そのウサギを屠殺し、骨折部分を細かく切り分け、モルフォゲン、例えばOP-1、の存在を確認するため探査する。この探査には標準的な免疫位置分析方法を利用し、蛍光ラベルを付けたウサギ抗OP-1抗血清を使用する。この手法によって、付随細胞群中のOP-1ならびに、筋肉、軟骨、および軟骨内骨の成長のための始原細胞群を確認する。さらに、OP-1は骨髄中に存在する多能性幹細胞群でも確認され、それが組織の修復および再生における形態形成の役割を果たしていることが示された。

OP-1タンパク質はラットの脳の中でも、標準的な免疫蛍光染色手法を用いて確認された。具体的には、成熟ラット脳(2-3月令)および脊髄を凍結し、切片に固定した。ウサギで養成し、標準的な方法によってOP-1アフィニティカラム上で精製した抗-OP-1を、これらの切片群に特定の結合をさせるために標準的な条件

下で加えた。次に、OP-1抗体が組織の切片に結合しているのを観察できるように、蛍光ラベルを付したヤギの抗-ウサギIgGを使用した。

図4Aおよび4Bに見られるように、免疫蛍光染色によってOP-1が成熟ラットの中樞神経系(CNS)に存在することがわかる。同様の、より広範な染色が脳(4A)および脊髄(4B)の両方に認められる。OP-1は主として灰白質の細胞外マトリックスに局在し、ニューロン細胞群を除くすべてのエリアに存在する。白質部分では、染色は星状神経細胞群に限られている。同様の染色パターンは新生ラット(10日令)の脳の切片中にも認められる。

組織の分化

本発明のモルフォゲン類の細胞分化能力は、若い間充細胞群をモルフォゲンの存在下で培養し、培養した細胞群をトリジンブルーで着色し、その細胞を組織学的に研究することによって確認することができる。例えば、下顎骨に成長することになっているラットの間充細胞群を、ステージ11で、上にかぶさっている上皮細胞から切り離し標準的な組織培養条件で試験管で培養すると、分化は継続しない。しかしながら同じ細胞群をあと1日、上にかぶさっている内胚葉に接触したままにしておくと、この時にはステージ12の細胞群になっているが、これらの細胞群は試験管内でも軟骨細胞群を形づくるように分化を続ける。さらに造骨細胞群への分化、そして最終的に、下顎骨に分化するためには適当な局所環境、例えば血管形成の環境、が必要である。

モルフォゲン、例えばOP-1、の存在下で試験管内で培養されたステージ11の間充細胞群は、試験管内で軟骨細胞群を形づくるように分化を続けることがすでに発見されている。これらのステージ11細胞群はまた、もし上を覆っている内胚葉細胞群から取り出された細胞産生物群とともに試験管内で培養されれば、試験管内で分化を続ける。そのうえ、OP-1は、内胚葉細胞群で調整された媒体の中に、Western Blot法または免疫蛍光法のいずれかで確認することができる。この実験は、異なるモルフォゲン類の細胞分化能力を評価したり、異なる成長組織群内でのそれらの分布を

調べるために、その他のモルフォゲン類ならびに異なる間充細胞群群を使って行うことができる。

モルフォゲン誘導の細胞分化のもう一つの例として、神経細胞群の分化に対するOP-1の効果が培養でテストされた。具体的には、NG108-15の神経芽細胞×神経膠細胞ハイブリッドクローン化細胞系統に対するOP-1の効果の評価が行われた。この細胞系統は培養中、繊維芽細胞的な形態形成を示した。この細胞系統は、0.5 mMのブチレート、1%のDMSOまたは5.00 mMのフェルスコリンを使い化学的に分化の誘導が可能で、培養された一次神経のほとんどすべての重要な神経特性の発現が誘導される。しかしながら、これらの細胞の化学的誘導は細胞分裂の終止も同時に誘導する。

本実験において、NG108-15細胞は、ポリ-L-リシンでコートされた6穴プレート群で細胞培養された。それぞれの穴には40-50,000個の細胞群が2.5 mlの化学的に規定された培養液の中に入っている。3日目に0.025%のトリフルオロ酢酸を含む60%エタノール中に入れた2.5 μlのOP-1をそれぞれの穴に加えた。0、1、10、40および100 ng/mlのOP-1濃度でテストが行われた。培養液は毎日OP-1の新しいアリコートに取り替えられた。40および100 ng/mlのOP-1濃度のものは4日後に、OP-1がNG108-15細胞群の分化を誘導した。図5はそこで起こった形態形成変化を示す。OP-1は細胞群の凝集および凝状化ならびに神経突起の形

成(プロセス)を誘導した。図5(純NC108-15細胞)と図5Bを比較すると、OP-1処理された細胞群の効果がわかる。このようにして、OP-1は細胞群が神経細胞形態形成へ分化してゆくのを誘導することができる。いくつかの神経突起群はシナプス型の結合部へと接合してゆく。この効果は1-100 ng/ml濃度のTGF- β 1で培養された細胞群では見られなかった。

OP-1の神経誘導効果は、NC108-15細胞群に対する化学的分化剤と類との比較で示された。50,000個の細胞群が6穴プレート上で培養され、プレート、DMSO、フェルスコリンまたはOP-1で4日間処理された。細胞数のカウントによって、化学的分化剤を含んだ培養液の中では、分化が細胞分裂の終止を伴うことが示された。対照的に、OP-1で分化が誘導された細胞群は、H3チミジンの摂取で確認されるとおり、分裂を続けた。このデータはOP-1が、分化の後培養中の細胞群の安定性を維持する能力のあることを示唆するものである。

さらに誘導するもう一つの例として、本発明のモルフォゲン類の、皮膚細胞群の“再分化”を誘導する能力についても評価が行われた。具体的には、OP-1のヒトEC細胞群(胎生胚細胞群、NTERA-2 CL1, D1)に対する効果をここに開示した。外部からの刺激がない状態で、これらの細胞群は未分化の幹細胞群として維持され、無血清培養液(SMF)の中で成長が誘導された。モルフォゲン処理がなされない場合、これらの細胞

群は勢いよく増殖し、固定液は無関係であった。モルフォゲン処理の効果は図6A-Dに示されている。図6Aおよび6Bは、SMF中における4日間の成長を示すもので、OP-1が存在した場合(25 ng/ml、6A)またはモルフォゲンが存在しない場合(6B)である。図6Cおよび6Dは、5日間の成長を示すもので、10 ng/mlのOP-1が存在した場合(6C)とモルフォゲンが存在しない場合(6D)である。図6Cおよび6Dは図6Aおよび6Bに対し、10倍および20倍の拡大率である。OP-1の存在下では、EC細胞は扁平細胞群に成長し、固定液依存性となるのがよくわかる。さらに、成長率は約10分の1に減少する。最後に、それらの細胞群の分化は誘導された。

表現型の維持

本発明のモルフォゲン類はまた細胞の分化された表現型を維持するのに使われる。この形態形成能力は特に、静止または老衰細胞群の中で、表現型の継続的な発現を誘導するのに有用である。

モルフォゲンの表現型維持能力は簡単に評価することができる。試験管の中で、標準培養条件下で多段階の過程を経過した後、多くの分化された細胞群が静止または老衰する。しかしもし、これらの細胞群が本発明のモルフォゲンの一つと一緒に試験管の中で培養されると、その細胞群は多段階の過程で、彼らの表現型の発現を維持するように誘導される。たとえば、培養された造血細胞

群のアルカリ性ホスファターゼ(磷酸酵素)の活動は、培養された骨肉腫細胞群や頭蓋冠細胞群と同じように、試験管の中では多段階の過程を経た後は大幅に減少する。しかしながら、もしそれらの細胞群がモルフォゲン(たとえばOP-1)の存在下で培養されると、アルカリ性ホスファターゼの活動性は長期間にわたって維持される。同じように、筋細胞群の表現型発現もまたこれらモルフォゲンの存在によって維持される。この実験は、異なるオリジンの細胞群に対する異なるモルフォゲン類の表現型維持能力を評価するために、その他のモルフォゲン類および異なる細胞群を用いて実施することができる。

表現型維持能力はまた生体でも、骨折しょう症のためのラットモデル、すなわち1991年8月30日出産のUSSN 752, 857、審査中、に開示されているもので、ここにレファレンスとして収録、を使用して評価することができる。そこで開示されているように、Ross Evansラット群を、発情ホルモンの産生減少で骨折しょう症の状態にするため、卵巣摘出を行う。卵巣摘出の8日後、ラット群に全身的に磷酸緩衝生理食塩水(PBS)またはOP-1(21 μ gまたは20 μ g)を22日間与える。しかる後ラット群を屠殺し、血清アルカリ性ホスファターゼのレベル、血清カルシウムレベル、血清カルシニンレベルを、標準的な方法で測定する。OP-1を1または20 μ g与えたラット群では3倍高いレベルの骨カルシウムが認められた。アルカリ性

ホスファターゼレベルもまた増加しているのが認められた。けい骨骨幹における組織形態計量分析でOP-1は、エストロゲンレベルの低下による骨質量を減らせることが判明した。

細胞にたいする刺激

本発明のモルフォゲン類が胎原細胞群の増殖を刺激する能力もまた簡単に試験管内で評価することができる。有用な純粋細胞群としては、多分骨腫または造血血液から標準的な方法で単離される多能性幹細胞群、(たとえば、Faradjiら、(1988) Vox Sang. 55(3):133-138またはBroxmeyerら、(1989) PNAS 86(10):3828-3832参照)、ならびに血液から得られる純粋細胞群がある。あるいは、胎生細胞群(たとえば、培養された中胚葉細胞系統からの)も有用である。

胎原細胞群を得るもう一つの方法ならびにモルフォゲン類の細胞増殖を刺激する能力を測定する方法は、胎原細胞群を生体ソースから捕まえることである。たとえば、移行胎原細胞群が流入できるような生体適合性のあるマトリックス材料を、生体中のあるサイトに胎原細胞群の流入を許すぐらい長時間移植する。たとえば、骨由来のグアニジン抽出のマトリックスを、たとえばSampaioら((1983) PNAS 80:6591-6595)、または米国特許No. 4,975,526に開示されている方法で作製、ラットの皮下部位に、基本的に

はSamprallらの方法(同上)に従って移植する。3日後移植物を取り除くと、マトリックスと一緒にあった始原細胞群は拡散され、培養される。

次に、どのようにして得た始原細胞群も、想定されるモルフォゲンとともに、当業界の普通の技術者にも公知の標準的な細胞培養条件で、試験管培養をする。外部からの刺激がない状態では、その始原細胞群は増殖しないか、あるいはその培養液の中で最低限の増殖をする。しかしながら、もしその細胞がOP-1のようなモルフォゲンの存在下で培養されると、増殖するように刺激される。細胞の成長は視覚的に確認するか、または公知の標準的な方法を用いて分光光度法で測定することができる。

始原細胞集団の増殖

始原細胞群は、生体内または生体外で、増殖するように刺激することができる。これらの細胞群は、個体内にモルフォゲンを含んだ医薬品処方を注射もしくは他の方法で与えることによって、生体内で刺激することができる。たとえば、個体の造血性の多能性幹細胞群数は、個体の骨髄に適当な濃度のモルフォゲンを注射か何かで与えることによって、増殖するように刺激することができる。

増加させたい始原細胞個体群にモルフォゲンを、液相状態で、細胞群の増殖を刺激するのに十分な濃度と時間接触させることによって、始原細胞群を生体外で刺激することができる。一般的には、約10分間から約24

時間の期間で充分である。この後、刺激されたこれらの細胞群を個体に、たとえば、適当な生体の遺伝子座に、注入する。生体適合性のある適当な始原細胞群は、公知の方法もしくはここに述べた方法のいずれかで得ることができる。

損傷したまたは病気にかかった組織の再生

本発明のモルフォゲン類は、ほ乳動物の疾病もしくは損傷した組織の再生に用いることができる。再生しようとする組織は、好ましくは鑑定評価し、必要に応じて、過度の死性もしくは干渉しそうな炎症組織を外科的、化学的、切除あるいはその他医学的に公知の方法で除去する。

しかる後、モルフォゲンを無菌で生体適合性のある組成物の一部として、直接組織遺伝子座に外科的移植法もしくは注射により与える。あるいは、モルフォゲン刺激を受けた始原細胞群を含む無菌の生体適合性のある組成物を組織の遺伝子座に与える。その遺伝子座に存在する組織は、病んでいたり損傷していても、始原細胞群の増殖および組織特異の分化をさせるための適当なマトリックスとなり得る。さらに、損傷したもしくは病んでいる組織の遺伝子座は、特に外科的手段でさらに傷められたものであっても、形態形成を許容する環境を与える。組織によっては、モルフォゲンを全身的に与えれば十分なものもある。

状態によっては、特に組織の損傷が広範囲の場合、その

組織が細胞の流入および増殖に十分なマトリックスを提供できないことがある。このような場合には、モルフォゲンもしくはモルフォゲン刺激をした始原細胞群を、下記のいずれかの方法で作られた生体適合性のある適当な固相マトリックスとともに、組織の遺伝子座に与える必要がある。このマトリックスは、組織特異性で生体内で生物分解性があり、かつ70-850 μ m、最も好ましくは150-420 μ m、の範囲の大きさの粒子群で構成されているものが望ましい。

本発明のモルフォゲン類はまた、ケガのあとのはん炭組織の生成を防止もしくは実質的に生成させないようにするためにも使うことができる。もしモルフォゲンが新たに傷ついた組織の遺伝子座に与えられると、移行線維芽細胞の未分化の接合組織への集結を防止しながら、その遺伝子座に組織の形態形成を誘導することができる。このモルフォゲンは、ケガの後5時間以内に、無菌の医薬品処方としてその遺伝子座に注射によって与えることが望ましい。異なる組織に対するモルフォゲン類の再生能力を示す、いくつかの発明を限定しない事例をつぎに紹介する。本発明のプロテイン類は軟骨および軟骨内骨形成を誘導する能力があることを以前に示した(たとえば、米国特許No. 5,011,691)。

一つの例として、部分的な肝切除後のかなり傷ついた肝臓組織のプロテイン誘導の形態形成が開示されている。この一般的なプロトコルの変型はその他の異なる組織群におけるモルフォゲン活性をテストするのににも使用でき

る。この一般的な方法には、組織の中の基本的に再生しない部分を切除すること、モルフォゲンを好ましくは溶解性の医薬品処方として、切除した組織の遺伝子座に与えること、キズをふさぎ、そのサイトを後日調べること、が含まれる。骨や肝臓のようなものは、胎児の段階以後は、キズついたあとで再生する能力を潜在的に有している。

モルフォゲン、(たとえば、成熟形の精製組み換えヒトOP-1)を0.1%のトリフルオロ酢酸(または同等の酸)を含む50%エタノール(または同等の溶剤)に溶解させた(1mg/ml)。OP-1/溶剤一液の貯蔵溶液1部を、滅菌したPBS(燐酸緩衝生理食塩水)に0.2%のラット血清アルブミンを溶解させたもの9部で希釈して、注射可能なOP-1溶液が作られた。

成長しつつあるラット群または成熟したラット群を、ケタミンを使って麻酔させた。2つの肝臓葉(右および左)を切除し(各葉の約1/3)、それぞれの切断端に沿った複数のサイトにOP-1を局所的に注射した。注入したOP-1の量は、10.0 μ gを100のPBS/RSA(燐酸緩衝生理食塩水/ラット血清アルブミン)注射緩衝液に入れたものであった。ブラシーボタンアル類にはOP-1を入れない注射緩衝液を使用した。それぞれのグループには5匹ずつのラット群を使用した。傷をふさぎ、ラット群は通常の餌を食べられるように、また水道水を飲めるようにした。

12日後、それらのラット群を屠殺し、肝臓の再生を目視観察した。図7の顕微鏡写真は、肝臓再生に関する

OP-1の劇的な効果を示している。OP-1注入グループは完全な肝臓組織再生を示し、肝臓の中に切り傷跡はなんら残っていないかった(動物2)。対照的に、PBSだけを注射したコントロールグループではごく僅かの再生だけが認められた(動物1)。さらに、このグループのサンプルには切開した跡が残っていた。

もう一つ別の例として、本発明モルフォゲン類の象牙質形成を誘導する能力も評価された。今日、歯科医療の分野においては歯髄組織のキズに対する予期せざる反応が治療上の根本的な問題である。

他の下等な非霊長類は乳動物類をベースとしたモデルよりも、遠くヒトの歯科生理学により近い指標になると思われることから、シノモルグス属が霊長類のモデルとして選ばれた。

標準的な歯の外科的手順によって、サンプルの歯の歯のすぐ上のエナメル質および象牙質を(ドリリングによって)取り除き、歯髄の小さな面積(たとえば、2mm)を外科的に露出させ、歯冠側の歯髄組織を部分的に切断して、止血を誘導しながら、歯の処理、穴の仮封および充填を標準的な手順で行った。

使われた歯処理は：キャリアマトリックスにOP-1を分散させたもの；キャリアマトリックスだけで無処理のもの。1匹12本の歯(それぞれの処理に4本ずつ)を用意し、2匹の歯を使用。4週間後に、歯を抜き取り象牙質の生成状況を分析するために組織学的に処理、および/または象牙質の無機質化を分析するためにすりつ

の幅をセクションに切り分けた。はん痘組織形成の程度を定性的に測定するために、グリプ原線維酸性プロテインに対する免疫蛍光染色で評価した。グリプ原線維酸性プロテインは神経線維はん痘に關するマーカープロテインである。切り分けたセクション群について、OP-1の存在を確認するために抗-OP-1抗体でブローブ探索もした。モルフォゲンで処理した動物検体群の切片中のグリプ原線維酸性プロテインのレベルが低いことは、モルフォゲンが神経線維はん痘形成を抑制する能力を証明するものであり、それによって神経の再生を刺激することになる。

モルフォゲンの活性の検出

本発明のモルフォゲン類に対する抗体群は高度なヒトの血清で確認されている。さらに、モルフォゲン類(たとえば、OP-1)を含んだ移植用デバイス類が、抗-モルフォゲン抗体(たとえば、抗-OP-1抗体)の増加を誘導するために、すでに発見されている。これらの抗体群は、生体内におけるモルフォゲン活動力に対する生体規制の一部分を構成するものと考えられる。抗体群の存在ならびにそれらのレベルの変動は簡単にモニターすることができ、それらは組織の均衡ならびに組織の生存度をモニターするための有用な方法を提供してくれることになる(たとえば、病理学的な状態の確認)。たとえば、標準的放射免疫測定法あるいはELISA法で血清中の内因性抗-モルフォゲン抗体を検知し定量するこ

とができる。図8はモルフォゲンの骨髄象牙質修復の劇的な効果を示している。図8Aは対照処理(PBS)の顕微鏡写真で、修復はほとんど無いか全く見られなかった。図8Bはキャリアだけの場合の顕微鏡写真で、最少の修復を示している。対照的に、モルフォゲン処理のもの(図8C)はかなりの修復を示した。図8の結果は、外科手術的に露出された健康な歯髄群に対し、確かにOP-1-CM(OP-1にキャリアマトリックスを加えたもの)が修復のないしは骨髄象牙質ブリッジの形成を誘導したことを示している。対照的に、キャリアマトリックスだけで処理したもの、または処理しなかったものは、修復象牙質の形成はなかった。

もう一つの例として、中枢神経系(CNS)の修復に対するモルフォゲン誘導の再生効果をラットの脳脊髄モデルを使って評価することができる。要約すれば、このLong Evansラット群に麻酔をかけ、頭部手術の準備をする。頭蓋骨を標準的な外科手術手順で露出し、0.035Kのワイヤを使ってそれぞれの脳脊髄の中心に向かって穴を、ちょうど頭蓋骨を突き通すようにあける。モルフォゲン(OP-1、25μl)またはPBSのいずれかを含んだ25μlの溶液を、ハミルトンシリンジを使ってそれぞれの穴に入れる。溶液は表面から約3mmの深さまで、つまり下にある皮質、脳髄および海馬の中まで入れる。そのあと皮膚を縫合し、動物を回復させる。

手術の3日後、ラット群は断頭により屠殺し、それら

とができる。抗-モルフォゲン抗体群を検知できる抗体群あるいはその他の拘束性プロテイン類は標準的な方法により得ることができる。

マトリックスの性質

本発明のモルフォゲン類は、生体適合性のある、好ましくは生体中で体内分解性のある適当に修飾されたマトリックス中に分散されて外科的に移植される。マトリックスは、中にモルフォゲンを分散させるためと始源細胞群の移入、分化および増殖をさせるための構造を与えるためである。マトリックスはまた、基本的に成長抑制信号類を含まないもので、分化する細胞群に組織特異性を方向付けるための信号類を与え、同時に形態形成を許容する環境を与えられるものでなければならない。

これらの特性を備えたものでなければ、そのマトリックスは形態形成用組成物の部分としては適当なものではないことになる。骨形成用デバイス類(調整したマトリックス内にモルフォゲン類を分散したもの)に關する最近の研究において、ポリ乳酸およびまたはポリグリコール酸バイオポリマー類、セラミック類(トリ-カルシウム-フォスフェートの一つ)、またはヒドロキシアパタイトなどから作られたマトリックス類は、それ自体、ラット鼠に新たな軟骨内骨形成を誘導する適当な環境を与えることができないものであることが判明した。さらに、市場で入手できる高度に精製された再構成されたコラーゲン類または天然物から作られた獨特のコラーゲ

ン類(たとえば、ラットの尾の腱からの)で構成されたマトリックス類もまた骨形成性プロテインとともに移植したとき骨形成を誘導することができなかった。これらのマトリックス類は明らかに、モルフォゲンに刺激され分化する始原細胞群の組織特異性の方向付けを助ける、特定の構造関連特性が欠如している。

調整されたマトリックスは、想定される手術で望まれるような形に作られたり、手術の最中に医者や技師によって必要な形に作ることができる。このようにこの材料は、組織を修復したり、新たにその成長を誘導するために、局所的、皮下、腔膜組織内、あるいは筋肉内の移植用に使用される。このマトリックスは生体内で生物分解性があるもの、つまり体に徐々に吸収されかつ新しい組織成長に、移植した形ないしはそれに近い形で、置きかえられるものが望ましい。

本発明に有用なマトリックス類の作り方および使用方法の詳細を次に説明する。

組織から作るマトリックス類

適切な生体適合性、生体内分解性のある無細胞性マトリックス類は天然の組織から作ることができる。組織の細胞性の非構造成分を実質的に抽出するために、その組織を適当な薬剤で処理する。この薬剤類は、その組織に關与している成長抑制成分も同時に抽出できるものでなければならない。こうしてできたものは、多孔性、無細胞性の、非構造性成分が実質的に取り除かれた、マ

トリックス類である。

このマトリックスはさらに薬剤類で処理し、マトリックスの孔および表面の微細なくぼみの数を増やすような修飾をすることができる。当業界の熟練技術者であれば、種々の組織の非構造成分の抽出に最適な薬剤類を選択する方法を知っている。たとえば、肝臓や肺のような柔らかい組織類であれば、強く切り分け、組織の細胞性構造を破壊し非構造性成分群を抽出するために、たとえば100%エタノールのような無毒性の溶剤にさらす。次に、この材料を乾燥し粉末に砕き、非付着性の多孔性粒子群を得る。コラーゲンが主成分であるような軟骨や象牙質のような構造性組織の場合は、基本的にはSampathらの方法(1983)PNAS 80:6591-6595)に準拠して、脱塩し、グアニジンで抽出をする。たとえば、粉末化され脱塩された象牙質は、5倍の4Mグアニジン-塩酸、50mM Tris-塩酸を使用して、pH 7.0、4°Cで16時間抽出する。次にこの懸濁液をろ過する。残った不溶解成分を回収し、マトリックスを作るために使用する。この材料はほとんどコラーゲン状のものである。これは形態形成能力に欠けるものである。このマトリックス粒子群をさらにコラーゲンの原線維修正薬剤で処理し、望ましくないと考えられる成分群をマトリックスから抽出すると同時にマトリックス材料の表面構造を変える。有用な薬剤類は酸類、有機溶剤類または加熱した水溶性溶媒である。これらのマトリックス処理の詳細は、米国特許No. 4,975,526お

よびPCT広報US90/00912、1990年9月7日発行(WO90/10018)に開示されている。

現在最も好ましいとされている薬剤は、マトリックスの粒子表面積および多孔度を増加させるための、水のような加熱した水溶性の原線維修正溶媒である。現在最も好まれている水溶性溶媒はpH約4.5以下、たとえば、加熱前のコラーゲンが“萎縮”するのを助けることができるようなpH 2-pH 4の範囲、のものである。0.1%の酢酸、pH約3、が現在最も好まれている。0.1Mの酢酸も使用可能である。

種々の量の脱脂、脱塩、グアニジン抽出された骨コラーゲンを、水ジャケット付きのガラスフラスコ中でコンスタントに攪はんしながら、水溶性溶媒(1gマトリックス/30ml水溶性溶媒)の中で、加熱し、所定時間一定温度に保つ。処理時間としては1時間程度が好ましいが、0.5から2時間の間であればよい。使用する温度は37°Cから55°Cの範囲で一定に保つ。現在好まれている加熱処理温度は約45°Cから50°Cの範囲内である。

この熱処理の後、そのマトリックスは濾過、洗浄、凍結乾燥され、移植用に使われる。酸性の水溶性溶媒が使われたときは、そのマトリックスは洗浄、凍結乾燥の前に中和される。現在好まれている中和用の緩衝液は、pH 7.0の200mM磷酸ナトリウム緩衝液である。マトリックスを中和するため、マトリックスは熱処理の後まず冷却され、酸性水溶性溶媒(たとえば、0.1%酢

酸)が除去され、中和緩衝液に置き換えられ、約30分間そのマトリックスを振動する。そして中和緩衝液を除去し、マトリックスを洗浄し、凍結乾燥する。

その他の有用な原線維修正処理としては、酸処理(たとえば、トリフルオロ酢酸および弗化水素)、ならびにジクロロメタン、アセトニトリル、イソプロパノール、クロロホルムなどの溶剤ならびに特定の酸/溶剤の組み合わせによる溶剤処理がある。

原線維修正薬剤に接触させた後、処理されたそのマトリックスから残っている抽出成分群を除去するために、下記の手順に従って、洗浄する：

1. マトリックス調整品をTBS(Tris緩衝生理食塩水)中に懸濁し、4°Cで2時間攪はんする；またはpH 7.0の6M尿素、50mM Tris-塩酸、50mM塩化ナトリウム溶液(UTBS)または水の中で、30分間(pHを中和するのに必要とされる充分な時間)室温(RT)で攪拌し、
2. 遠心分離および、洗浄ステップをくりかえし、
3. 遠心分離し、上澄み液を捨て、残留物を水洗し、凍結乾燥する。

合成の組織特異性マトリックス類

上述の天然物からの組織特異性マトリックスに加えて、有用な組織特異性のマトリックスを合成によって、もし適正に修飾されるならば、作ることもできる。これらの多孔性で生体適合性があり、生体中の体内分解性を有え

た合成マトリックス膜が、PCT広報US91/03503、発行1991年12月12日(WO91/18558)に開示されており、ここにレフェレンスとして収録した。要約すれば、そのマトリックスは、生体適合性、体内分解性のあるコラーゲンならびに、組織特異性の細胞付着因子群としての組織特異性のグリコサミノグリカン類の適当なものと、多孔性架橋構造性ポリマーを含んだものである。不溶性コラーゲン、酸に可溶のコラーゲン、中性または塩基性水溶液に可溶のコラーゲン、市場で入手可能なコラーゲン類などを含めて、いろいろなソースからのコラーゲンがこれらの合成マトリックス膜として使うのに適当であろう。

グリコサミノグリカン類(GAGs)またはムコ多糖類は動物起源のヘキソースアミンを含んだ多糖類で、組織特異の分布を有しており、したがってモルフォゲンに刺激された分化細胞群の組織特異性の決定を助けるために使うことができる。GAGsとの反応性はまたコラーゲンにもう一つ別の貴重な特性、すなわち、動物宿主からの免疫反応(異物に対する反応)を誘発させない能力、を与えることになる。

化学的には、GAGsは、グリコシド結合し、幾らか規則的にヘキソウロン酸またはヘキソース部分のどちらかと入れ替わっているヘキソースアミン類から構成されている(例えば、Dodgson on Carbohydrate Metabolism and its Disorders (編集 Dickens) vol. 1、

Academic Press (1968) 参照)。有用なGAGsには、ヒアルロン酸、ヘパリン、ヘパリンサルフェート、コンドロイチン6-サルフェート、コンドロイチン4-サルフェート、デルマトンサルフェート、およびケラチンサルフェートがある。その他のGAGsもここに述べたマトリックスを作るのに適しており、当業界の熟練者はその他の適当なGAGsを知っているか、あるいは通常の実験操作を使うだけでそれらを確認することができる。ムコ多糖類のさらに詳細な記述は、Aspinall, Polysaccharides, Pergamon Press, Oxford (1970)を参照されたい。たとえば、米国特許出願No. 529,852に開示されているように、コンドロイチン6-サルフェートは軟骨内骨成形が要求されることに使用できる。一方、ヘパリンサルフェートは筋組織の修復用のマトリックス膜を作るのに使用できる。

コラーゲンは、水溶性の酸性多糖、好ましくは希釈された酢酸の中で、GAGと反応させることができる。コラーゲンの水性分散液にGAGを滴下すると、GAGに被覆され、絡まったコラーゲン繊維の共沈物ができる。この絡まった繊維のかたまりをホモジナイズし、微細な繊維群の均一な分散液とし、ついで、ろ過および乾燥する。

コラーゲン-GAG組成物の不溶性はこれらの材料を共有架橋結合させることによって望ましいレベルまで上げることができ、これはまたこれらの材料の再吸収に

対する抵抗性を上げることに役立つ。一般的には、脱水サマルプロセスによる架橋が好まれるが、コラーゲンの架橋に適する共有架橋方法であれば、いずれの方法もこれらの複合材料の架橋にも通ずる。

乾燥したとき、架橋された粒子は基本的に球状であり、直径約500 μ mである。走査電子顕微鏡によれば、表面の孔は約20 μ mで、内部の孔は約40 μ mである。内部は繊維状およびシート様両方の構造物群からなっており、細胞付着用の界面を提供している。空隙部は内部でつながっており、細胞群が粒子の内部のどこにでもアクセスできるようになっている。この材料の空隙容積はほぼ99.5%であり、マイクロキャリーのグラム単位あたりの潜在的な細胞の質量、これは成長してゆくものであるが、という観点からは、極めて効率的な材料となっている。

ここに述べてきたモルフォゲン類は、下記のいずれかの方法を使って、適切に修飾された組織特異のマトリックスと組み合わせ、そしてその中に分散させて使用することができる：

1. エタノールによる沈降

グアニジン-塩酸に溶解させたモルフォゲン中にマトリックスを加える。サンプルははげしく攪はんし、低温でインキュベートする。サンプルはその後さらに過飽和はんされる。この混合物に冷純エタノールを加え、攪はん、インキュベートする。遠心分離(高速のマイクロ遠心分離)の後、上澄み液を捨てる。マトリックスは冷純溶

エタノールにより水の中で洗浄し、そのあと凍結乾燥する。

2. アセトニトリル3氧化酢酸による凍結乾燥

この手順において、アセトニトリル3氧化酢酸にモルフォゲンを入れた溶液(ACN/TFA)をキャリア物質に加える。激しくサンプルを何度も攪はんし、そのあと凍結乾燥する。

3. 緩衝生理食塩水凍結乾燥

生理食塩水に入れたモルフォゲン調整物もまたマトリックスとともにはげしく攪はんし、形態形成的に活性な物質を得るために凍結乾燥する。

生物学的評価

本発明のモルフォゲン類および形態形成用組成物の、生体内における形態形成の有用性を評価するための種々の方法を次に示す。これらのプロテイン類および組成物類は、数多くの公知の方法のいずれかに使って、胚乳動物に注射もしくは外科的に移植される。たとえば、外科的移植の生物学的評価は基本的にはSampathらの方法(1983)PNAS 80:5591-5595に準拠して行う。

組織学的評価

生体内における形態形成の程度を調べるためには、特に組織の修復の手順においては、組織学的な切り分け(セクショニング)および着色が好ましい。切りとられた

移植物は Bouillon 溶液中に固定され、パラフィンに埋め込まれ、6-8 μm のセクション群に切り分けられる。トルイジンブルーまたはヘマトキシリン/エオシンによる着色によって新しい組織の最終的な発達が明確に示される。移植物が新しく誘導された組織を含んでいるかどうか認定するためには通常12日間の移植で十分である。

移植が成功する場合、誘導組織の発達ステージを通して、コントロールされた進展を示すため、起こっている組織特異の事象群を確認し追跡することができる。たとえば、軟骨内骨形成に含まれるステージは：(1) 1日目に白血球；(2) 2日目および3日目に間充細胞の移入および増殖；(3) 5日目および6日目に軟骨細胞の出現；(4) 7日目に軟骨マトリックスの生成；(5) 8日目に軟骨の石灰化；(6) 3日目および10日目に血管の侵入、造骨細胞群の出現、および新しい骨の生成；(7) 12日目から18日目にかけて造骨細胞および骨のリモデリングがあらわれ、移植したマトリックスが溶ける；(8) 21日目に小骨の中で造骨性の骨髄分化、が含まれる。

生物学的環境問題

組織学的評価に加えて、生物学的環境問題も組織の形態形成のマーカーとして使うことができる。有用なマーカーとしては、組織特異の酵素類があり、移植物を均質化した後、それらの活動を評価分析（たとえば、分光光度

計測定によって）する。これらの評価分析は、移植物を動物から取り除いた後に、迅速に定量ならびに組織形成の推定をするのに有用である。たとえば、アルカリ性ホスファターゼの活動を骨形成におけるマーカーの一つとして利用することができる。

全身的に与えられたモルフォゲン類はタグをつけた（たとえば、放射線ラベルをつけて）モルフォゲン類を使って追跡し、新しい組織の中でのそれらの局在を確認したり、および/または循環系からそれらが消失するのを、標準の麻酔誘導組織プロトコルを利用してモニターする。このモルフォゲンはまた、組織特異の分子タグと一緒に与えることもでき、その取り込みをモニターしたり、与えられたモルフォゲン濃度との相関性をみることができる。一つの例として、足のラット群の部外除去は、結果として骨のアルカリ性ホスファターゼの低下を招き、それらのラット群を骨粗しょう症に間かせた。もしこれらのラット群に今度はモルフォゲン、たとえば OP-1 を与えると、カルシウム (Ca^{2+}) の全身的濃度の低下がみられ、これらは与えられたモルフォゲンの存在と相関し、アルカリ性ホスファターゼ活性の増加との対応がみられる。

本発明の精神または基本的な特性から逸脱せずに本発明を別の特定の形で実施することが可能である。本発明の実施例はしたがって、すべての点において説明のためのものであり、本発明を制限するものではない。発明の範囲は前述の説明ではなく、付帯の請求項に示されて

おり、したがって、あらゆる変更で請求項の意味および同等の範囲に入るものはすべて、それらの請求項の範囲に入るものとみなす。

記 列 表

- (i) 一般情報：
 - (i) 特許出願人： コーヘン、チャールズ エム、クベラサンバス、サンガベルパン、ロイ エッチ、エル、オッパーマン、ハーマン リューガー、デイビッド シー。
 - (ii) 発明の名称： タンパク質によって誘導される形態形成
 - (iii) 配列の数： 23
 - (iv) 優先権：
 - (A) 所： テキサス、ハーウィツ & ナーゴルト
 - (B) 街： 53 ステート ストリート
 - (C) 市： ボストン
 - (D) 州： マサチューセッツ
 - (E) 国： アメリカ合衆国
 - (F) 郵便番号： 02109
 - (v) コンピュータで読取り可能な形式：
 - (A) 媒体： フロッピー ディスク
 - (B) コンピュータ： IBM PC 互換機
 - (C) オペレーティングシステム： PC-DOS/MS-DOS
 - (D) ソフトウェア： Patentia
 - リリース No. 1,
 - バージョン No. 1.25
 - (vi) 先出願データ
 - (A) 出願番号： US 667, 274
 - (B) 出願日： 1991年3月11日
 - (vii) 先出願データ
 - (A) 出願番号： US 752, 764
 - (B) 出願日： 1991年8月30日

(2) SEQ ID No. : 1 に関する情報

(i) 配列の特性

- (A) 長さ: 97 アミノ酸
(B) 種類: アミノ酸
(C) 形状: 直線

(ii) 分子の種類: タンパク質

(ix) 特徴:

- (A) 名称: 一般配列1

- (D) その他の情報: 各Xaa は天然に存在する20のL-異性体α-アミノ酸のうちの1つまたはその1つの誘導体を示す。

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 1

```

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1           5
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
10          15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20          25
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
30          35
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
40          45          50
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
55          60
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
65          70
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
75          80
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85          90
Xaa Cys Xaa
95

```

```

85          90
Xaa Cys Xaa
95

```

(2) SEQ ID No. : 3 に関する情報

(i) 配列の特性

- (A) 長さ: 97 アミノ酸
(B) 種類: アミノ酸
(C) 形状: 直線

(ii) 分子の種類: タンパク質

(ix) 特徴:

- (A) 名称: 一般配列3

- (D) その他の情報: 各Xaa は、この明細書中に示したような、1つまたは複数の指定されたアミノ酸のグループから、独立に選択される。

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 3

```

Leu Tyr Val Xaa Phe
1           5
Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa
10
Xaa Ala Pro Gly Xaa Xaa Xaa Ala
15          20
Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa
25          30
Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35
Xaa Xaa Xaa Ala His His Xaa Xaa

```

(2) SEQ ID No. : 2 に関する情報

(i) 配列の特性

- (A) 長さ: 97 アミノ酸
(B) 種類: アミノ酸
(C) 形状: 直線

(ii) 分子の種類: タンパク質

(ix) 特徴:

- (A) 名称: 一般配列2

- (D) その他の情報: 各Xaa は天然に存在する20のL-異性体α-アミノ酸のうちの1つまたはその1つの誘導体を示す。

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 2

```

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1           5
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
10          15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20          25
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
30          35
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
40          45          50
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
55          60
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
65          70
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
75          80
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

```

```

40          45
Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa
50
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
55          60
Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
65
Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
70          75
Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa
80
Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa
85          90
Xaa Cys Gly Cys Xaa
95

```

(2) SEQ ID No. : 4 に関する情報

(i) 配列の特性

- (A) 長さ: 102 アミノ酸
(B) 種類: アミノ酸
(C) 形状: 直線

(ii) 分子の種類: タンパク質

(ix) 特徴:

- (A) 名称: 一般配列4

- (D) その他の情報: 各Xaa は、この明細書中に示したような、1つまたは複数の指定されたアミノ酸のグループから、独立に選択される。

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 4

特表平6-506360 (28)

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Tyr Val Xaa Phe
 1 5 10
 Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa
 15
 Xaa Ala Pro Xaa Gly Xaa Xaa Ala
 20 25
 Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa
 30 35
 Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 40
 Asn Xaa Xaa Iln His Ala Xaa Xaa
 45 50
 Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 55
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 60 65
 Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 70
 Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
 75 80
 Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa
 85
 Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa
 90 95
 Xaa Cys Gly Cys Xaa
 100

85 30
 Val His Phe Ile Asn Pro Glu Thr Val
 95
 Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Glu
 100 105
 Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe
 110 115
 Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys
 120 125
 Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala
 130 135
 Cys Gly Cys His

(2) SEQ ID No: 5 に関する情報

(i) 配列の特性

- (A) 長さ: 139アミノ酸
 (B) 種類: アミノ酸
 (C) 形状: 直鎖

(ii) 分子の種類: タンパク質

(ia) 特徴:

- (A) 名称: mOP-1 (成熟形)

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 5

Ser Thr Gly Gly Lys Glu Arg Ser Glu
 1 5
 Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys Asn Glu
 10 15
 Glu Ala Leu Arg Met Ala Ser Val Ala
 20 25

(2) SEQ ID No: 5 に関する情報

(i) 配列の特性

- (A) 長さ: 139アミノ酸
 (B) 種類: アミノ酸
 (C) 形状: 直鎖

(ii) 分子の種類: タンパク質

(ia) 特徴:

- (A) 名称: hOP-1 (成熟形)

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 5

Ser Thr Gly Ser Lys Glu Arg Ser Glu
 1 5
 Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys Asn Glu
 10 15
 Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala
 20 25
 Glu Asn Ser Ser Ser Asp Glu Arg Glu
 30 35
 Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val
 40 45
 Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Glu Asp
 50
 Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala
 55 60
 Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala
 65 70
 Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala
 75 80
 Thr Asn His Ala Ile Val Glu Thr Leu

Glu Asn Ser Ser Ser Asp Glu Arg Glu
 30 35
 Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val
 40 45
 Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Glu Asp
 50
 Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala
 55 60
 Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala
 65 70
 Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala
 75 80
 Thr Asn His Ala Ile Val Glu Thr Leu
 85 90
 Val His Phe Ile Asn Pro Asp Thr Val
 95
 Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Glu
 100 105
 Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe
 110 115
 Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys
 120 125
 Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala
 130 135
 Cys Gly Cys His

特表平6-506360 (29)

(2) SEQ ID No: 7 に関する情報

(1) 配列の特性

(A) 長さ: 139アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 形状: 直線

(11) 分子の種類: タンパク質

(12) 特徴:

(A) 名称: hOP-2 (成熟形)

(21) 配列の識別名: SEQ ID NO: 7

```

Ala Val Arg Pro Leu Arg Arg Arg Gln
1          5
Pro Lys Lys Ser Asn Glu Leu Pro Gln
10         15
Ala Asn Arg Leu Pro Gly Ile Phe Asp
20         25
Asp Val His Gly Ser His Gly Arg Gln
30         35
Val Cys Arg Arg His Glu Leu Tyr Val
40         45
Ser Phe Glu Asp Leu Gly Trp Leu Asp
50
Trp Val Ile Ala Pro Gln Gly Tyr Ser
55         60
Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ser
65         70
Phe Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn Ala
75         80
Thr Asn His Ala Ile Leu Gln Ser Leu

```

```

20         25
Asp Gly His Gly Ser Arg Gly Arg Gln
30         35
Val Cys Arg Arg His Glu Leu Tyr Val
40         45
Arg Phe Arg Asn Leu Gly Trp Leu Asp
50
Trp Val Ile Ala Pro Gln Gly Tyr Ser
55         60
Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala
65         70
Phe Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn Ala
75         80
Thr Asn His Ala Ile Leu Gln Ser Leu
85         90
Val His Leu Met Lys Pro Asp Val Val
95
Pro Lys Ala Cys Cys Ala Pro Thr Lys
100        105
Leu Ser Ala Thr Ser Val Leu Tyr Tyr
110        115
Asp Ser Ser Asn Asn Val Ile Leu Arg
120        125
Lys His Arg Asn Met Val Val Lys Ala
130        135
Cys Gly Cys His

```

```

85          90
Val His Leu Met Lys Pro Asn Ala Val
95
Pro Lys Ala Cys Cys Ala Pro Thr Lys
100        105
Leu Ser His Thr Ser Val Leu Tyr Tyr
110        115
Asp Ser Ser Asn Asn Val Ile Leu Arg
120        125
Lys His Arg Asn Met Val Val Lys Ala
130        135
Cys Gly Cys His

```

(2) SEQ ID No: 8 に関する情報

(1) 配列の特性

(A) 長さ: 139アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 形状: 直線

(11) 分子の種類: タンパク質

(12) 特徴:

(A) 名称: mOP-2 (成熟形)

(21) 配列の識別名: SEQ ID NO: 8

```

Ala Ala Arg Pro Leu Lys Arg Arg Gln
1          5
Pro Lys Lys Thr Asn Glu Leu Pro His
10         15
Pro Asn Lys Leu Pro Gly Ile Phe Asp

```

(2) SEQ ID No: 9 に関する情報

(1) 配列の特性

(A) 長さ: 96アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 形状: 直線

(11) 分子の種類: タンパク質

(12) 特徴:

(A) 名称: CBMP-2A (f x)

(21) 配列の識別名: SEQ ID NO: 9

```

Cys Lys Arg His Pro Leu Tyr Val Asp Phe Ser
1          5          10
Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro
15          20
Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu
25          30
Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser
35          40
Thr Asn His Ala Ile Val Glu Thr Leu Val Asn
45          50          55
Ser Val Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys
60          65
Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu
70          75
Tyr Leu Asp Glu Asn Glu Lys Val Val Leu Lys
80          85
Asn Tyr Glu Asp Met Val Val Glu Gly Cys Gly
90          95
Cys Arg
100

```

(2) SEQ ID No: 10 に関する情報

(1) 配列の特性

- (A) 長さ: 101 アミノ酸
(B) 種類: アミノ酸
(C) 形状: 直鎖

(11) 分子の種類: タンパク質

(1a) 特徴:

- (A) 名称: CBMP-2B (fx)

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 10

```

Cys Arg Arg His Ser
1          5
Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn
10         15
Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr Gln Ala
20         25
Phe Tyr Cys His Gly Asp Cys Pro Phe Pro Leu
30         35
Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile
40         45
Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Ser
50         55         60
Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Gln Leu
65         70
Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Tyr
75         80
Asp Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Glu Met
85         90
Val Val Gln Gly Cys Gly Cys Arg
95         100

```

(2) SEQ ID No: 12 に関する情報

(1) 配列の特性

- (A) 長さ: 102 アミノ酸
(B) 種類: アミノ酸
(C) 形状: 直鎖

(11) 分子の種類: タンパク質

(1a) 特徴:

- (A) 名称: Vgl (fx)

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 12

```

Cys Lys Lys Arg His Leu Tyr Val Gln Phe Lys
1          5          10
Asp Val Gly Trp Gln Asn Trp Val Ile Ala Pro
15         20
Gln Gly Tyr Met Ala Asn Tyr Cys Tyr Gly Gln
25         30
Cys Pro Tyr Pro Leu Thr Gln Ile Leu Asn Gly
35         40
Ser Asn His Ala Ile Leu Gln Thr Leu Val His
45         50         55
Ser Ile Gln Pro Gln Asp Ile Pro Leu Pro Cys
60         65
Cys Val Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Ser Met
70         75
Leu Phe Tyr Asp Asn Asn Asp Asn Val Val Leu
80         85
Arg His Tyr Gln Asn Met Ala Val Asp Gln Cys
90         95
Gly Cys Arg
100

```

(2) SEQ ID No: 11 に関する情報

(1) 配列の特性

- (A) 長さ: 102 アミノ酸
(B) 種類: アミノ酸
(C) 形状: 直鎖

(11) 分子の種類: タンパク質

(1a) 特徴:

- (A) 名称: DPP (fx)

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 11

```

Cys Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser
1          5          10
Asp Val Gly Trp Asp Asp Trp Ile Val Ala Pro
15         20
Leu Gly Tyr Asp Ala Tyr Tyr Cys His Gly Lys
25         30
Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Phe Asn Ser
35         40
Thr Asn His Ala Val Val Gln Thr Leu Val Asn
45         50         55
Asn Asn Asn Pro Gly Lys Val Pro Lys Ala Cys
60         65
Cys Val Pro Thr Gln Leu Asp Ser Val Ala Met
70         75
Leu Tyr Leu Asn Asp Gln Ser Thr Val Val Leu
80         85
Lys Asn Tyr Gln Gln Met Thr Val Val Gly Cys
90         95
Gly Cys Arg
100

```

(2) SEQ ID No: 13 に関する情報

(1) 配列の特性

- (A) 長さ: 102 アミノ酸
(B) 種類: アミノ酸
(C) 形状: 直鎖

(11) 分子の種類: タンパク質

(1a) 特徴:

- (A) 名称: Vgr-1 (fx)

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 13

```

Cys Lys Lys His Gln Leu Tyr Val Ser Phe Gln
1          5          10
Asp Val Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro
15         20
Asn Gly Tyr Ala Ala Asn Tyr Cys Asp Gly Gln
25         30
Cys Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala
35         40
Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His
45         50         55
Val Met Asn Pro Gln Tyr Val Pro Lys Pro Cys
60         65
Cys Ala Pro Thr Lys Val Asn Ala Ile Ser Val
70         75
Leu Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Leu
80         85
Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys
90         95
Gly Cys His
100

```

特表平6-506360 (31)

(2) SEQ ID No: 14 に関する情報

(i) 配列の特性

- (A) 長さ: 106 アミノ酸
(B) 種類: タンパク質
(C) 個数: 単価
(D) 形状: 直鎖

(ii) 分子の種類: タンパク質

(vi) 起源

- (A) 生物: ヒト
(B) 組織: 脳

(ix) 特徴:

- (D) その他の情報:

/product="GDP-1 (fx)"

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 14

```

Cys Arg Ala Arg Arg Leu Tyr Val Ser Phe Arg Glu Val Gly
1           5           10
Trp His Arg Trp Val Ile Ala Pro Arg Gly Phe Leu Ala Asn Tyr
15          20          25
Cys Glu Gly Glu Cys Ala Leu Pro Val Ala Leu Ser Gly Ser Gly
30          35          40
Gly Pro Pro Ala Leu Asn His Ala Val Leu Arg Ala Leu Met His
45          50          55
Ala Ala Ala Pro Gly Ala Ala Asp Leu Pro Cys Cys Val Pro Ala
60          65          70
Arg Leu Ser Pro Ile Ser Val Leu Phe Phe Asp Asn Ser Asn Asn
75          80          85
Val Val Leu Arg Glu Tyr Gly Asp Met Val Val Asp Glu Cys Gly
90          95          100
Cys Arg
105

```

```

GGTGGGGGGG GGGAGGGGGG AGCCCGGGA GCGGTAGAG CGGCGCGG ATG CAC GTG 57
Met His Val
1
CGG TCA CTG CGA GCT GCG GCG CCG CAC AGC TTC CTG GCG CTC TCG GCA 105
Arg Ser Leu Arg Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala Leu Trp Ala
5           10           15
CGC CTG TTC CTG CTG CGC TCC GCG CTG GCG GAC TTC AGC CTG CAC AAC 153
Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser Leu Asn Asn
20          25          30          35
GAG GTG CAC TCG AGC TTC ATC CAC CGG CGC CTC GCG AGC CAG GAG GCG 201
Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser Glu Glu Arg
40          45          50
CGG GAG ATG CAG CGG GAG ATC CTC TCC ATT TTG GCG TTG CCG CAG CGG 249
Arg Glu Met Glu Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu Pro His Arg
55          60          65
CGC CGC CGC CAC CTC CAG GCG AAG CAC AAC TCG GCA CCC ATG TTC ATG 297
Pro Arg Pro His Leu Glu Gly Lys His Asn Ser Ala Pro Met Phe Met
70          75          80
CTG GAC CTC TAC AAC GCG ATG GCG GTG GAG GAG GCG GCG GCG GCG GCG 345
Leu Asn Leu Tyr Asn Ala Met His Val Glu Glu Gly Gly Pro Gly
85          90          95
GGC CAG GCG TTC TCC TAC CCC TAC AAG GCG GTC TTC AGT ACC CAG GCG 393

```

(2) SEQ ID No: 15 に関する情報

(i) 配列の特性

- (A) 長さ: 5 アミノ酸
(B) 種類: アミノ酸
(C) 個数: 単価
(D) 形状: 直鎖

(ii) 分子の種類: ペプチド

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 15

```

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
1           5

```

(2) SEQ ID No: 16 に関する情報

(i) 配列の特性

- (A) 長さ: 1822塩基対
(B) 種類: 核酸
(C) 個数: 単価
(D) 形状: 直鎖

(ii) 分子の種類: cDNA

(vi) 起源

- (A) 生物: ヒト
(B) 組織: 腸胃

(ix) 特徴:

- (A) 名称/キー: CDS
(B) 場所: 49, 1341
(D) その他の情報: /standard-name="hOPI"

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 16

```

Gly Glu Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser Thr Glu Gly
100          105          110          115
CGC CCT CTG GCC AGC CTG CAA GAT AGC CAT TTC CTC ACC GAC GCC GAC 441
Pro Pro Leu Ala Ser Leu Glu Asp Ser His Phe Leu Thr Asp Ala Asp
120          125          130
ATG GTC ATG AGC TTC GTC AAC CTC GTG CAA CAT GAC AAG GAA TTC TTC 489
Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys Glu Phe Phe
135          140          145
CAC CCA CGC TAC CAC CAT CGA GAG TTC CGG TTT GAT CTT TCC AAG ATC 537
His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu Ser Lys Ile
150          155          160
CCA GAA GGG GAA GCT GTC AGC GCA GCG GAA TTC CGG ATC TAC AAG CAC 585
Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Asp
165          170          175
TAC ATC CGG GAA CGC TTC GAC AAT GAG AGC TTC CGG ATC ACC GTT TAT 633
Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile Ser Val Tyr
180          185          190          195
CAG GTG CTC CAG GAG CAC TTG GCG AGG GAA TCG GAT CTC TTC CTG CTC 681
Glu Val Leu Glu Glu His Leu Gly Arg Glu Ser Asp Leu Phe Leu Leu
200          205          210
GAG AGC CGT ACC CTC TGG GCG TCG GAG GAG GCG TCG CTC GTG TTT GAC 729
Asp Ser Arg Thr Leu Trp His Ser Glu Glu Gly Trp Leu Val Phe Asp

```

215 220 225

ATC ACA GGC ACC AGC AAC CAC TGG GTG GTC AAT CGG CGG CAC AAC CTG 177
 Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Thr Val Val Asn Pro Arg His Asn Leu
 230 235 240

GGC CTC CAG CTC TCG CTC GAG AGC CTC GAT CGG CAG AGC ATC AAC CCG 825
 Gly Leu Glu Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Glu Ser Ile Asn Pro
 245 250 255

AAG TTG GCG GGC CTG ATT GCG CGG CAC GCG CCC CAG AAC AAG CAG CCC 873
 Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Glu Asn Lys Glu Pro
 260 265 270 275

TTC ATG GTG GCT TTC TTC AAG GCG AGC GAG GTC CAG TTC CCG AGC ATC 921
 Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe Arg Ser Ile
 280 285 290

CGC TCC ACC GCG ACC AAA CAG CGG AGC CAG AAC CGC TCC AAG AGC CCG 969
 Arg Ser Thr Gly Ser Lys Glu Arg Ser Glu Asn Arg Ser Lys Thr Pro
 295 300 305

AAG AAC CAG GAA GCG CTC CGG ATG GCG AAC GTG GCA CAG AAC ACC AGC 1017
 Lys Asn Glu Gly Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser
 310 315 320

AGC GAC CAG AGG CAG GCG TGT AAG AAG CAC GAG CTG TAT GTC AGC TTC 1065
 Ser Asp Glu Arg Glu Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe
 325 330 335

TGTGAGACTA TTAGGAACAA TGAGGACGAT ATGGCTTTTG ATCAGTTTTT CAGTGGCAGC 1531

ATGCANTGAA CAGATGCTTA CAGGCTGTCC AGGCAAAACC TAGCAGGAAA AAAAAACGAC 1591

GCATTAACAA AATGGCCCGG GCGAGGTGAT TGGCTGGAAA GTCTCAGCCA TGCACGAGCT 1651

CGTTCCAGA GGTAAATATG AGCGCTTACC AGCCAGGCCA CCCAGCGCTG GGAGGAAGGG 1711

GGGCTGGCAA GGGGTGGGCA CATGGCTGTC TGTGCGAAGG GAAATTTGAC CCGGAAGTTC 1771

CTGTAATAAA TGTCAACAATA AAGCAATCA ATGAAAAAAA AAAAAAATAA A 1822

(2) SEQ ID No: 17 に関する情報

(1) 配列の特性

(A) 長さ: 431アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 形状: 直線

(11) 分子の種類: タンパク質

(12) 特徴:

(D) その他の情報: /Product="OP1-PP"

(11) 配列の識別名: SEQ ID NO: 17

Met His Val Arg Ser Leu Arg Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala
 1 5 10 15

Leu Thr Ala Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser
 20 25 30

GSA GAC CTC GGC TGG CAG GAG ATC ATC GCG CCT GAA GGC TAC GCG 1113
 Arg Asp Leu Gly Thr Glu Asp Thr Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala
 340 345 350 355

GCC TAC TAC TGT GAG GGG GAG TGT GCG TTC CCT CTG AAC TCC TAC ATC 1161
 Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met
 360 365 370

AAC GCG ACC AAC CAC GCG ATC GTG CAG AGC CTG GTC CAC TTC ATC AAC 1209
 Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Glu Thr Leu Val His Phe Ile Asn
 375 380 385

CCG GAA AGC GTG GCG AAG CGC TCG TGT GCG CCC AGC CAG CTC AAT GCG 1257
 Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Glu Leu Asn Ala
 390 395 400

ATC TCC GTC CTC TAC TTC GAT GAG AGC TCC AAC GTC ATC CTC AAG AAA 1305
 Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys
 405 410 415

TAC AGA AAC ATG GTG GTC CCG GCG TGT GCG TCC CAG TAGCTCCTCC 1351
 Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
 420 425 430

GACAAATCAG ACCCTTTCGG GCCAAGTTTT TCTGGAGCT CCATTGCTCG CCTTGGCCAG 1411

GACCAAGCAG ACCAAGTGGC TTTTGTGAGA CTTCCGCCCT CCTATCCCA ACTTTAAGG 1471

Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser
 35 40 45

Glu Glu Arg Arg Glu Met Glu Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu
 50 55 60

Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Glu Gly Lys His Asn Ser Ala Pro
 65 70 75 80

Met Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly Gly
 85 90 95

Gly Pro Gly Gly Glu Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser
 100 105 110

Thr Glu Gly Pro Pro Leu Ala Ser Leu Glu Asp Ser His Phe Leu Thr
 115 120 125

Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys
 130 135 140

Glu Phe Phe His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu
 145 150 155 160

Ser Lys Ile Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile
 165 170 175

Tyr Lys Asp Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile
 180 185 190

特表平6-506360 (33)

Ser Val Tyr Gln Val Leu Gln Glu His Leu Gly Arg Glu Ser Asp Leu
195 200 205

Phe Leu Leu Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu
210 215 220

Val Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg
225 230 235 240

His Asn Leu Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser
245 250 255

Ile Asn Pro Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn
260 265 270

Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe
275 280 285

Arg Ser Ile Arg Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser
290 295 300

Lys Thr Pro Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Gln
305 310 315 320

Asn Ser Ser Ser Asn Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr
325 330 335

Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asn Trp Ile Ile Ala Pro Glu

340 345 350

Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Gln Cys Ala Phe Pro Leu Asn
355 360 365

Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Glu Thr Leu Val His
370 375 380

Phe Ile Asn Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln
385 390 395 400

Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asn Asp Ser Ser Asn Val Ile
405 410 415

Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
420 425 430

(2) SEQ ID No: 18 に関する情報

(1) 配列の特性

- (A) 長さ: 1875 塩基対
- (B) 種類: 核酸
- (C) 価数: 単鎖
- (D) 形状: 直線

(1i) 分子の種類: cDNA

(vi) 起源

- (A) 生物: ネズミ科の動物
- (B) 組織: 胎児

(1a) 特徴:

- (A) 名称/ネー: CDS
- (B) 場所: 104...1393
- (D) その他の情報: /note="MOPI (cDNA)"
- (xi) 配列の識別名: SEQ ID NC: 18

CTCCAGCAAG TGACCTCGGG TCCTGACGG CTGGCTGGC CCCTCGCTG CCACCTGGG 60

CGGCGCGGGC CCGTGGGCG GCATCGGGG TAGAGCGGG CGG ATG CAC GTG CGC 115
Met His Val Arg
1

TGG CTG CGG GCT GCG GCG CCA CAC AGC TTC GTG GCG CTC TGG GCG CCT 163
Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala Leu Trp Ala Pro
5 10 15 20

CTG TTC TTG CTG CGC TCG GCG CTG GCG GAT TTC AGC CTG GAC AAC GAG 211
Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser Leu Asp Asn Gln
25 30 35

GTC CAC TCC AGC TTC ATC CAC CGG GCG CTC CGC AGC CAG GAG CGG CGC 259
Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser Gln Glu Arg Arg
40 45 50

GAG ATG CAG CGG GAG ATC CTG TCC ATC TTA GGG TTG CCG CAT CGC CGG 307
Gln Met Gln Arg Gln Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu Pro His Arg Pro
55 60 65

CGG CGG CAC CTC CAG GGA AAG CAT AAT TCG GCG CCC ATG TTC ATG TTG 355
Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro Met Phe Met Leu
70 75 80

GAG CTG TAC AAC GCC ATG GCG GTG GAG AGC GGG CGG GAC GGA CAG 403
Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Gln Gln Ser Gly Pro Asp Gly Gln
85 90 95 100

GGC TTC TCC TAC CCC TAC AAG GCG GTC TTC AGT ACC CAG GCG CCC CCT 451
Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser Thr Gln Gly Pro Pro
105 110 115

TTA GCG AGC CTG CAG GAC AGC CAT TTC CTC ACT GAC GCG GAC ATG GTC 499
Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr Asp Ala Asp Met Val
120 125 130

ATG AGC TTC GTC AAC CTA GTG GAA CAT CAC AAA GAA TTC TTC CAC CCT 547
Met Ser Phe Val Asn Leu Val Gln His Asp Lys Glu Phe Phe His Pro
135 140 145

CGA TAC CAC CAT CGG GAG TTC CGG TTT GAT CTT TCC AAG ATC CCG GAG 595
Arg Tyr His His Arg Gln Phe Arg Phe Asp Leu Ser Lys Ile Pro Glu
150 155 160

GCG GAA GCG CTG ACC GCA GCG GAA TTC AGC ATC TAT AAG GAC TAC ATC 643
Gly Gln Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Asp Tyr Ile
165 170 175 180

CGG GAG CGA TTT CAC AAC GAG ACC TTC CAG ATC ACA GTC TAT CAG TGG 691
Arg Gln Arg Phe Asn Asn Glu Thr Phe Gln Ile Thr Val Tyr Gln Trp
185 190 195

特表平6-506360 (34)

CTC CAG GAG CAC TCA GGC AGG GAG TCG GAG CTC TTC TTS GTC GAG AGC 739
 Leu Glu Glu His Ser Gly Arg Glu Ser Asp Leu Phe Leu Leu Asp Ser
 200 205 210

CGC ACC ATC TGG GCT TCT GAG GAG GGC TGG TTT GAT ATC ACA 787
 Arg Thr Ile Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu Val Phe Asp Ile Thr
 215 220 225

GGC ACC AGC AAC CAC TCG GTC GTC AAC CCT CGG CAG AAC CTG GGC TTA 835
 Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg His Asn Leu Gly Leu
 230 235 240

CAG CTC TCT GTC CAG ACC CTC GAT GGC CAG AGC ATC AAC CCC GAG TTE 883
 Glu Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Glu Ser Ile Asn Pro Lys Leu
 245 250 255 260

GCA GGC CTG ATT GGA CGG CAT GGA GGC CAG AAC CAA GGC TTC ATG 931
 Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Glu Asn Lys Glu Pro Phe Met
 265 270 275

GTG GGC TTC TTC AAG GGC ACC GAA GTC CAT CTC CCT AGT ATC CGG TCC 979
 Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Leu Arg Ser Ile Arg Ser
 280 285 290

AGC GGC CGC AAG CAG CGC AGC CAG AAT CGC TCC AAG AGC CCA AAG AAC 1027
 Thr Gly Gly Lys Glu Arg Ser Glu Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys Asn
 295 300 305

CAA CAG GGC CTG AGS ATG GGC AGT GTG GCA GAA AAC AGC AGC AGT GAC 1075

Glu Glu Ala Leu Arg Met Ala Ser Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser Asp
 310 315 320

CAG AGC CAG GGC TCG AAG AAA CAT CAG CTC TAC GTC AGC TTC CGA GAC 1123
 Glu Arg Glu Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp
 325 330 335 340

CTT GGC TGG CAG GAG TCG ATC ATT GCA CCT GAA GGC TAT GCT GGC TAC 1171
 Leu Gly Trp Glu Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr
 345 350 355

TAC TGT GAG GSA GAG TCG GGC TTC CCT CTC AAC TCG TAC ATG AAC GGC 1219
 Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala
 350 355 370

ACC AAC CAG GGC ATC GTC CAG ACA CTG GTT CAG TTC ATC AAC CCA GAG 1267
 Thr Asn His Ala Ile Val Glu Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro Asp
 375 380 385

ACA GTA GGC AAG GGC TCG TGT GGC GGC ACC CAG CTC AAC GGC ATC TCT 1315
 Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Glu Leu Asn Ala Ile Ser
 390 395 400

GTC CTC TAC TTC CAG GAG AGC TCT AAT GTC ATC CTG AAG AAG TAC ACA 1363
 Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg
 405 410 415 420

AAC ATG GTC GTC CGG GGC TGT GGC TCG CAG TAGCTCTCC TGAGACCTG 1413
 Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
 425 430

ACCTTTGGGG GGGCAGCCT TTCCAAATCT TCGATGTCTC ACCATCTAAG TCTCTACCTG 1473

CGACGCTTGG CGAGGAGAAC AGACCAACCT CTCTGAGGC TTGCTCAGC TCCCAAGGGG 1533

AAGCATGTAA GGGTTCGAGA AACCTGAGGG TGCAGCAGCT GATGAGCGCC CTTCCTTCT 1593

GGACGCTGAC GGACGAGATC CTACCAAGTA GCACAGCAAA GGCCTAAGAG CAGGAATAAT 1653

GTCTGCGAGG AAAGTGTCCA GTCTGCACAT GGGCCCTGGG GCTCTGAGTC TTTCAGGAGT 1713

AATGCGAAGC CTCTGTTCAG TCCAGCAGAA GGAAGGGCTT AGCCAGGGTG GGGCCTGGCG 1773

TCTGTGTTGA AGCGAAGCCA AGCAGAGGCC ACTCTAATGA TATCTACACG TAAAGACCAT 1833

GAATCAAAAA AAAAAAANA AAAAAAANA AAAAAAATC 1873

Met His Val Arg Ser Leu Arg Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala
 1 5 10 15

Leu Trp Ala Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser
 20 25 30

Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser
 35 40 45

Glu Glu Arg Arg Glu Met Glu Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu
 50 55 60

Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Glu Gly Lys His Asn Ser Ala Pro
 65 70 75 80

Met Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn His Met His Val Glu Glu Ser Gly
 85 90 95

Pro Asp Gly Glu Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser Thr
 100 105 110

Glu Gly Pro Pro Leu Ala Ser Leu Glu Asn Ser His Phe Leu Thr Asn
 115 120 125

His Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys Glu
 130 135 140

(2) SEQ ID No: 19 に関する情報

(i) 配列の特性

- (a) 長さ: 430アミノ酸
- (b) 領域: アミノ酸
- (c) 形状: 直線
- (d) 分子の種類: タンパク質
- (e) 特徴:
- (f) その他の情報: /product="mOP1-PP"
- (g) 配列の識別名: SEQ ID NO: 19

持表平6-506360 (35)

Phe Phe His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu Ser
 145 150 155 160
 Lys Ile Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Glu Ile Thr
 180 185 190
 Val Tyr Glu Trp Leu Glu Glu His Ser Gly Arg Glu Ser Asp Leu Phe
 195 200 205
 Leu Leu Asp Ser Arg Thr Ile Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu Val
 210 215 220
 Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg His
 225 230 235 240
 Asn Leu Gly Leu Glu Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Glu Ser Ile
 245 250 255
 Asn Pro Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Glu Asn Lys
 260 265 270
 Glu Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Leu Arg
 275 280 285
 Ser Ile Arg Ser Thr Gly Gly Lys Glu Arg Ser Glu Asn Arg Ser Lys
 290 295 300

Thr Pro Lys Asn Glu Glu Ala Leu Arg Met Ala Ser Val Ala Glu Asn
 305 310 315 320
 Ser Ser Ser Asp Glu Arg Glu Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val
 325 330 335
 Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Glu Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly
 340 345 350
 Tyr Ala Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser
 355 360 365
 Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Glu Thr Leu Val His Phe
 370 375 380
 Ile Asn Pro Asp Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Glu Leu
 385 390 395 400
 Asn His Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu
 405 410 415
 Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
 420 425 430

(2) SEQ ID NO: 20 に関する情報

(i) 配列の特性

(A) 長さ: 1723塩基対

(B) 種類: 核酸

- (C) 塩数: 単鎖
 (D) 形状: 直鎖
 (ii) 分子の種類: cDNA
 (vi) 起源
 (A) 生物: ヒト
 (B) 組織: 海馬
 (ix) 特徴:
 (A) 名称/キー: CDS
 (B) 場所: 490..1596
 (D) その他の情報: /note="hOP2 (cDNA)"
 (xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 20

GGGCCCGGCA GAGGAGGAGT GCTGGAGCA GCTGTGTTG GAGCAGGAG TGGCAGGCA 50
 GGGCTGGAGG GCTCCCTATG AGTGGGAGG AGGGCCGAGG AGGGCTTGA GCAACAGCTC 120
 CCACACCGCA CGAAGCGGTG GCTCCAGGAG CTGGCCGATC GGGCTGCGG TGTCTGGACC 180
 GCGCCGACAG CGGACTGGC GGGTACGGG CGGACAGAGG CATTGGCGCA GATCCCGAGT 240
 CGGACAGTA GGGCCGCGT CGAGGCGGTG GCGTCCCGGT CTTCTCGCTC CAGGAGCCAG 300
 GACAGGCTGC GCGCGCGGAG GCTCCAGGGA CGGCGCTCA GGGCGCTGC CGGCGGTC 360
 GCGCGCGGCC GCGCGCGCGG GCGCGCGGCA GCGGAGCTC CTTGCGCTGC GGGCGTCC 420
 AGGCGCTGAG TGGCGCGGAG AGCGGATGCG GCGCGCTCA GCGGCGCAG TCGGCGGCC 480
 CGGCGTGGC ATG AGC GGG CTC GCG GCG CGG CTC TCG CTC CTC GCG CTC 528

Met Thr Ala Leu Pro Gly Pro Leu Trp Leu Leu Gly Leu
 1 5 10
 GCG CTA TGC GCG CTG GCG GGG GCG GCG CCC GCG CTG CGA CCC CGC CGC 576
 Ala Leu Cys Ala Leu Gly Gly Gly Gly Pro Gly Leu Arg Pro Pro Pro
 15 20 25
 GCG TGT CCC CAG CGA CGT CTG GCG GCG GCG GCG CGG GAC GTG CAG 524
 Gly Cys Pro Glu Arg Arg Leu Gly Ala Arg Glu Arg Arg Asp Val Glu
 30 35 40 45
 GCG GAG ATC CTG GCG GTG CTC GGG CTG CCG GCG CCC CGG CGC GCG 672
 Arg Glu Ile Leu Ala Val Leu Gly Leu Pro Gly Arg Pro Arg Pro Arg
 50 55 60
 GCG CGA CGC GCG GCG TCC CGG CTC GCG GCG TCC GCG CGG CTC TTC ATG 720
 Ala Pro Pro Ala Ala Ser Arg Leu Pro Ala Ser Ala Pro Leu Phe Met
 65 70 75
 CTG GAC CTG TAC CAC GCG ATG GCG GCG GAC GAC GAG GAC GCG GCG 768
 Leu Asp Leu Tyr His His Met His Gly Asp Asp Asp Glu Asp Gly Ala
 80 85 90
 GCG GCG GAG CGG GCG CTC GCG GCG GCG GCG CTC CTC ATG AGC TTC ATT 816
 Pro His Glu Arg Arg Leu Gly Arg Ala Asp Leu Val Met Ser Phe Val
 95 100 105
 AAC ATG GTG GAG CGA GAC CGT GCG GCG GCG GAG GAG GCG CAT TCG 864
 Asn Met Val Glu Arg Asp Arg Ala Leu Gly His Glu Glu Pro His Trp
 110 115 120 125

持表平6-506360 (36)

AAC GAG TTC GCG TTT GAC CTC ACC CAG ATC CCG GCT GCG GAG GCG GTC	912	CAA GCG GCG CCA GCG TCC CAA CAG CCT TTC GTC CTC ACT TTC TTC AGG	1248
Lys Glu Phe Arg Phe Asp Leu Thr Gln Ile Pro Ala Gly Glu Ala Val		Gln Arg Ala Pro Arg Ser Glu Gln Pro Phe Val Val Thr Phe Phe Arg	
130 135 140		240 245 250	
ACA GCT GCG GAG TTC CCG ATT TAC AAG GTG CCC AGC ATC CAG CTC CTC	960	GCG AGT CCG AGT CCC ATC GCG ACC CCT GCG GCA GTC AGG CCA CTC AGG	1296
Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Val Pro Ser Ile His Leu Leu		Ala Ser Pro Ser Pro Ile Arg Thr Pro Arg Ala Val Arg Pro Leu Arg	
145 150 155		255 260 265	
AAC AGG AGC CTC CAC CTC AGC ATG TTC CAG GTG GTC CAG GAG CAG TCC	1008	AGG AGG CAG CCG AAG AAA AGC AAC GAG CTC CCG CAG GCG AAC CCA CTC	1344
Asn Arg Thr Leu His Val Ser Met Phe Gln Val Val Glu Glu Gln Ser		Arg Arg Gln Pro Lys Lys Ser Asn Glu Leu Pro Gln Ala Asn Arg Leu	
160 165 170		270 275 280 285	
AAC AGG GAG TCT GAC TTC TTT TTG GAT CTY CAG AGC CTC CGA GCT	1056	CCA GCG ATC TTT GAT GAC GTC CAC GCG TCC CAG GCG CCG CAG GTC TCC	1392
Asn Arg Glu Ser Asp Leu Phe Phe Leu Asp Leu Gln Thr Leu Arg Ala		Pro Gly Ile Phe Asp Asp Val His Gly Ser His Gly Arg Gln Val Cys	
175 180 185		290 295 300	
GGA GAC GAG GCG TCG CTC GTG GAT GTC ACA GCA GGC AGT GAC TGC	1104	GCT CCG CAG CAG CTC TAC GTC AGC TTC CAG GAC CTC GCG TCG CTC GAC	1440
Gly Asp Glu Gly Trp Leu Val Leu Asp Val Thr Ala Ala Ser Asp Cys		Arg Arg His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln Asp Leu Gly Trp Leu Asp	
190 195 200 205		305 310 315	
TGC TTC CTG AAG CGT CAC AAG GAC CTG GGA CTC CCG CTC TAT GTG GAG	1152	TGC GTC ATC GCT CCG CAA GGC TAC TCG GCG TAT TAC TGT CAG GCG GAG	1488
Trp Leu Leu Lys Arg His Lys Asp Leu Gly Leu Arg Leu Tyr Val Gln		Trp Val Ile Ala Pro Gln Gly Tyr Ser Ala Tyr Tyr Cys Gln Gly Gln	
210 215 220		320 325 330	
ACT CAG GAC GCG CAC AGC GTG GAT CCT GCG CTG GCG GCG CTC GGT	1200	TGC TCC TTC CCA CTG CAC TCG TCG ATG AAT GCG AGC AAC CAG GCG ATC	1536
Thr Glu Asp Gly His Ser Val Asp Pro Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly		Cys Ser Phe Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile	
225 230 235		335 340 345	
		CTG CAG TCC CTG GTC CAC CTG ATC AAG CCA AAC GCA GTC CCC AAG GCG	1584

Leu Glu Ser Leu Val His Leu Met Lys Pro Asn Ala Val Pro Lys Ala
350 355 360 365

TGC TGT GCA CCC ACC AAG CTG AGC GCG ACC TCT GTG CTC TAC TAT CAC
Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Ser Ala Thr Ser Val Leu Tyr Tyr Asp
370 375 380

AGC AGC AAC AAC GTC ATC CTC GCG AAA CAC CCG AAC ATG GTC GTC AAG
Ser Ser Asn Asn Val Ile Leu Arg Lys His Arg Asn Met Val Val Lys
385 390 395

GCG TCG GCG TCG CAC T GAGTCAGCGC GCCAGCCCT ACTGCAG
Ala Cys Gly Cys His
400

(2) SEQ ID NO: 21 に関する情報

(1) 配列の特性

(A) 長さ: 402 アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 形状: 変換

(ii) 分子の種類: タンパク質

(iv) 特徴:

(A) その他の情報: /product="hOP2-PP"

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 21

Met Thr Ala Leu Pro Gly Pro Leu Trp Leu Lys Gly Leu Ala Leu Cys
1 5 10 15
Ala Leu Gly Gly Gly Gly Pro Gly Leu Arg Pro Pro Gly Cys Pro
20 25 30

Gln Arg Arg Leu Gly Ala Arg Glu Arg Arg Val Gln Arg Gln Ile
35 40 45

Leu Ala Val Leu Gly Leu Pro Gly Arg Pro Arg Pro Arg Ala Pro Pro
50 55 60

Ala Ala Ser Arg Leu Pro Ala Ser Ala Pro Leu Phe Met Leu Asp Leu
65 70 75 80

Tyr His Ala Met Ala Gly Asp Asp Asp Glu Asp Gly Ala Pro Ala Gln
85 90 95

Arg Arg Leu Gly Arg Ala Asp Leu Val Met Ser Phe Val Asn Ser Val
100 105 110

Glu Arg Asp Arg Ala Leu Gly His Gln Glu Pro His Trp Lys Glu Phe
115 120 125

Arg Phe Asp Leu Thr Gln Ile Pro Ala Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala
130 135 140

Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Val Pro Ser Ile His Leu Leu Asn Arg Thr
145 150 155 160

Leu His Val Ser Met Phe Gln Val Val Gln Gln Ser Asn Arg Gln
165 170 175

Ser Asp Leu Phe Phe Leu Asp Leu Gln Thr Leu Arg Ala Gly Asp Glu
180 185 190

持表平6-506360 (37)

Gly Trp Leu Val Leu Asp Val Thr Ala Ala Ser Asp Cys Trp Leu Leu
195 230 205

Lys Arg His Lys Asp Leu Gly Leu Arg Leu Tyr Val Glu Thr Glu Asp
210 215 220

Gly His Ser Val Asp Pro Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly Glu Arg Ala
225 230 235 240

Pro Arg Ser Gln Glu Pro Phe Val Val Thr Phe Phe Arg Ala Ser Pro
245 250 255

Ser Pro Ile Arg Thr Pro Arg Ala Val Arg Pro Leu Arg Arg Arg Gln
250 265 270

Pro Lys Lys Ser Asp Glu Leu Pro Gln Ala Asn Arg Leu Pro Gly Ile
275 280 285

Phe Asp Asp Val His Gly Ser His Gly Arg Gln Val Cys Arg Arg His
290 295 300

Glu Leu Tyr Val Ser Phe Glu Asp Leu Gly Trp Leu Asp Trp Val Ile
305 310 315 320

Ala Pro Gln Gly Tyr Ser Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ser Phe
325 330 335

Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Leu Glu Ser
340 345 350

Leu Val His Leu Met Lys Pro Asn His Val Pro Lys Ala Cys Cys Ala
355 360 365

Pro Thr Lys Leu Ser Ala Thr Ser Val Leu Tyr Tyr Asp Ser Ser Asn
370 375 380

Asn Val Ile Leu Arg Lys His Arg Asn Met Val Val Lys Ala Cys Gly
385 390 395 400

Cys His

(2) SEQ ID No: 22 に関する情報

(i) 配列の特性

(A) 長さ: 1926塩基対

(B) 塩基: 塩基

(C) 塩基: 塩基

(D) 形状: 直線

(ii) 分子の種類: cDNA

(vi) 起源

(A) 生物: ネズミ科の動物

(P) 組織: 胎児

(ix) 特徴

(A) 名称/キー: CDS

(B) 場所: 93..1289

(D) その他の情報: /note="mOP2 cDNA"

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 22

CCAGCCGACA GGTGCGCGGT CTGCTCTCC CGCTCTGGG TCAGCGGAGC 50

CCAGCCGAGT ACCAGTCGAT CCGCCCGGCG TGAAGTCCG AG ATG GCT ATG GCT 104
Met Ala Met Arg
1

CCC GGG CCA CTC TGG CTA TTG GGC GTT CTG CTG TGG GCG CTG GGA GGC 152
Pro Gly Pro Leu Trp Leu Leu Gly Leu Ala Leu Cys Ala Leu Gly Gly
5 10 15 20

GGC GAC GGT CCG CGT CCG CCG CAC ACC TGT CCG CAG CGT GCG CTG GGA 200
Gly His Gly Pro Arg Pro Pro His Thr Cys Pro Gln Arg Arg Leu Gly
25 30 35

GGC GCG CAG CCG CCG CAC ATG CAG CGT GAA ATC CTG GCG GTG CTC GCG 248
Ala Arg Glu Arg Arg Asp Met Glu Arg Glu Ile Leu Pro Val Leu Gly
40 45 50

CTA CCG GGA CCG CCG CCA CCG CGT GCA CAA CCG CCG GCT GCG CCG CAG 296
Leu Pro Gly Arg Pro Arg Pro Arg Ala Glu Pro Ala Ala Ala Arg Gln
55 60 65

CCA CCG TCC GCG CCG CTC TTC ATG TTG CAC CTA TAC CAC GCG ATG ACC 344
Pro Ala Ser Ala Pro Leu Phe Met Leu Asp Leu Tyr His Ala Met Thr
70 75 80

GAT GAC GAC GAC GCG GCG GCG CCA CAG GCT CAC TTA GCG CGT GCG GAC 392
Asp Asp Asp Asp Gly Gly Pro Pro Gln Ala His Leu Gly Arg Ala Asp
85 90 95 100

CTG CTC ATG AGC TTC GTC AAC ATG GTG GAA CCG GAC CGT ACC CTG GCG 440

Leu Val Met Ser Phe Val Asn Met Val Glu Arg Asp Arg Thr Leu Gly
105 110 115

TAC CAG GAG CCA CAC TGG AAG GAA TTC CAC TTT CAC CTA ACC CAG ATC 488
Tyr Glu Glu Pro His Trp Lys Glu Phe His Phe Asp Leu Thr Glu Ile
120 125 130

GCT GCT GCG CAG GCT GTC ACA GCT GCT GAG TTC CCG ATC TAC AAA GAA 536
Pro Ala Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Glu
135 140 145

CCC ACC ACC CAC CCG CTC AAC ACA ACC CTC CAC ATC ACC ATG TTC GAA 584
Pro Ser Thr His Pro Leu Asn Thr Thr Leu His Ile Ser Met Phe Glu
150 155 160

GTG GTC CAA CAG CAC TCC AAC AGG GAG TCT GAC TTC TTC TTT TTG GAT 632
Val Val Glu Glu His Ser Asn Arg Glu Ser Asp Leu Phe Phe Leu Asp
165 170 175 180

CTT CAG ACC CTC CGA TCT GCG CAG CAG GCG TGG CTC GTC CTC GAC ATC 680
Leu Gln Thr Leu Arg Ser Gly Asp Glu Gly Trp Leu Val Leu Asp Ile
185 190 195

ACA GCA GCG AGT GAC CGA TCG CTG CTG AAC CAT CAC AAG GAC CTG GGA 728
Thr Ala Ala Ser Asp Arg Trp Leu Leu Asn His His Lys Asp Leu Gly
200 205 210

CTC GCG CTC TAT GTG GAA ACC GCG GAT GCG CAC AGC ATG GAT CCT GCG 776
Leu Arg Leu Tyr Val Glu Thr Ala Asp Gly His Ser Met Asp Pro Gly
215 220 225

特表平6-506360 (38)

CTG GCT GGT CTG GTT GGA GGA GAA GGA GGC TGC AGA CAG GGT TTC 824
Leu Ala Gly Leu Leu Gly Arg Gln Ala Pro Arg Ser Arg Gln Pro Phe
230 235 240

ATG GTA AGC TTC TTC AGC GGC AGC CAG AGT GGT GTC GGG GGC CCT CGG 872
Met Val Thr Phe Phe Arg Ala Ser Gln Ser Pro Val Arg Ala Pro Arg
245 250 255 260

GCA GCG AGA CCA CTG AAG AGC AGC CAG CCA AAG AAA AGC AAC GAG CTT 920
Ala Ala Arg Pro Leu Lys Arg Arg Gln Pro Lys Lys Thr Asn Gln Leu
265 270 275

CGC CAG CCC AAC AAA CTC CCA GGG ATC TTT GAT GAT GGC CAG GGT TCC 958
Pro His Pro Asn Lys Leu Pro Gly Ile Phe Asp Asp Gly His Gly Ser
280 285 290

CGC GGC AGA GAG GTT TGC GGC AGC GAT GAG CTC TAC GTC AGC TTC GGT 1016
Arg Gly Arg Gln Val Cys Arg Arg His Gln Leu Tyr Val Ser Phe Arg
295 300 305

GAC CTT GGC TGG CTG GAC TGG GTC ATC GCC CGC CAG GGC TAC TCT GGC 1064
Asp Leu Gly Trp Leu Asp Trp Val Ile Ala Pro Gln Gly Tyr Ser Ala
310 315 320

TAT TAC TGT GAG GGC GAG TGT GGT TTC CCA CTG GAC TCC TGT ATG AAC 1112
Tyr Tyr Cys Gln Gly Gln Cys Ala Phe Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn
325 330 335 340

CATACACTTA CATCAATGCA TCCCTGTACT CCCTGAATC AGAGCTAGCT TGTAGAAAA 1789
AGAAATCAGAG CCAGGTATAG CGGTGATGT CATTATGCC AGGCTAAAG AGACAGACAC 1849
AGGAGATCT CTGTGAGTTC AAGGCCATG ASAAAGAGCC TGTCTGCGCA GCAGGAAAA 1909
AAAAAAGAC GGAATTC 1925

(2) SEQ ID No: 23 に関する情報

(1) 配列の特性

- (A) 長さ: 399アミノ酸
(B) 種類: アミノ酸
(C) 形状: 連続

(ii) 分子の種類: タンパク質

(ix) 特徴:

(D) その他の情報: /product="mOP2-PP"

(vi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 23:

Met Ala Met Arg Pro Gly Pro Leu Trp Leu Leu Gly Leu Ala Leu Cys
1 5 10 15

Ala Leu Gly Gly Gly His Gly Pro Arg Pro Pro His Thr Cys Pro Gln
20 25 30

Arg Arg Leu Gly Ala Arg Gln Arg Arg Asp Met Gln Arg Gln Ile Leu Ala
35 40 45

GCC ACC AGC CAT GGC ATC TTG CAG TCT CTG CTC CAC CTG ATG AAG CCA 1160
Ala Thr Asn His Ala Ile Leu Gln Ser Leu Val His Leu Met Lys Pro
345 350 355

GAT GTT GTC CCC AAG GCA TGC TGT GCA CCC ACC AAA CTC AGT GCC AGC 1208
Asp Val Val Pro Lys Ala Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Ser Ala Thr
360 365 370

TCT GTG CTG TAC TAT GAC AGC AGC AAG AAT GTC ATC CTG CGT AAA CAC 1256
Ser Val Leu Tyr Tyr Asp Ser Ser Asn Asn Val Ile Leu Arg Lys His
375 380 385

CGT AAC ATG GTC GTC AAG GCC TGT GGC TGC CAG TGAGCCCCG CCACGATCC 1309
Arg Asn Met Val Val Lys Ala Cys Gly Cys His
390 395

TGCTTCTACT ACCTTACCAT CTGGCCGGGG CCCTCTCCAG AGGCAGAAAC CTTTATGT 1369

TATCATAGCT CAGACAGGGG CAATGGGAGG CCCTTCACTT CCCTTGCCCA CTTCCTGCTA 1429

AAATTCGTGT CTTCGCCAGT TCTCTCTGCT TTGATGGGGT TTGGGGCTTA TCACCCGCC 1489

CTCTCATGCC TCTACCCCA AGCATAGACT GAATGCACAC AGCATCCAG AGCTATGCTA 1549

ACTGACAGGT CTGGGTCAG CACTGAAGGC CCACATGAGG AAGACTGATC CTTCGCCATC 1609

CTCAGCCGAC ATGGGCAAT TCTGATGCT CTAGAGGCC CGTGCATTC TAACTAGAT 1669

GATCTGGGCT CTCTGCACCA TTCATTCTGC CAGTTGGGAC ATTITTAGGT ATACAGACA 1729

Val Leu Gly Leu Pro Gly Arg Pro Arg Pro Arg Ala Gln Pro Ala Ala
50 55 60 65

Ala Arg Gln Pro Ala Ser Ala Pro Leu Phe Met Leu Asp Leu Tyr His Ala
70 75 80

Met Thr Asp Asp Asp Asp Gly Gly Pro Pro Gln Ala His Leu Gly Arg
85 90 95

Ala Asp Leu Val Met Ser Phe Val Asn Met Val Gln Arg Asp Arg Thr
100 105 110

Leu Gly Tyr Gln Gln Pro His Trp Lys Gln Phe His Phe Asp Leu Thr
115 120 125 130

Gln Ile Pro Ala Gly Gln Ala Val Thr Ala Ala Gln Phe Arg Ile Tyr
135 140 145

Lys Gln Pro Ser Thr His Pro Leu Asn Thr Thr Leu His Ile Ser Met
150 155 160

Phe Gln Val Val Gln Gln His Ser Asn Arg Gln Ser Asp Leu Phe Phe
165 170 175

Leu Asp Leu Gln Thr Leu Arg Ser Gly Asp Gln Gly Trp Leu Val Leu
180 185 190

Asp Ile Thr Ala Ala Ser Asp Arg Trp Leu Leu Asn His His Lys Asn
195 200 205 210

特表平6-506360 (39)

Leu Gly Leu Arg Leu Tyr Val Glu Thr Ala Asp Gly His Ser Met Asp
 215 220 225
 Pro Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly Arg Glu Ala Pro Arg Ser Arg Glu
 230 235 240
 Pro Phe Met Val Thr Phe Phe Arg Ala Ser Glu Ser Pro Val Arg Ala
 245 250 255
 Pro Arg Ala Ala Arg Pro Leu Lys Arg Arg Glu Pro Lys Lys Thr Asn
 260 265 270
 Glu Leu Pro His Pro Asn Lys Leu Pro Gly Ile Phe Asp Asp Gly His
 275 280 285 290
 Gly Ser Arg Gly Arg Glu Val Cys Arg Arg His Glu Leu Tyr Val Ser
 295 300 305
 Phe Arg Asp Leu Gly Trp Leu Asp Trp Val Ile Ala Pro Glu Gly Tyr
 310 315 320
 Ser Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asp Ser Cys
 325 330 335
 Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Leu Glu Ser Leu Val His Leu Met
 340 345 350
 Lys Pro Asp Val Val Pro Lys Ala Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Ser
 355 360 365 370

Ala Thr Ser Val Leu Tyr Tyr Asp Ser Ser Asn Asn Val Ile Leu Arg
 375 380 385
 Lys His Arg Asn Met Val Val Lys Ala Cys Gly Cys His
 390 395

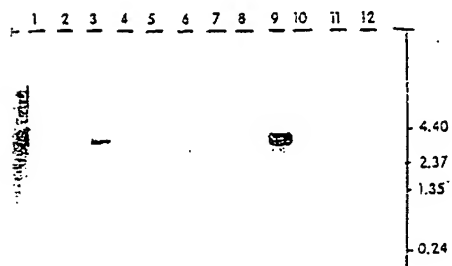


Fig. 1

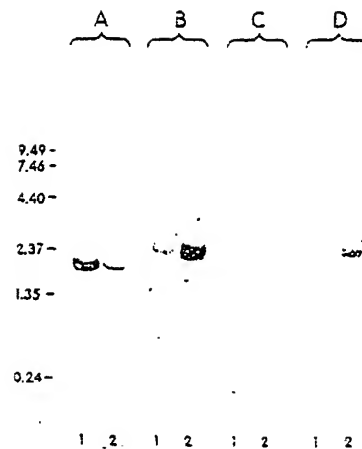


Fig. 2

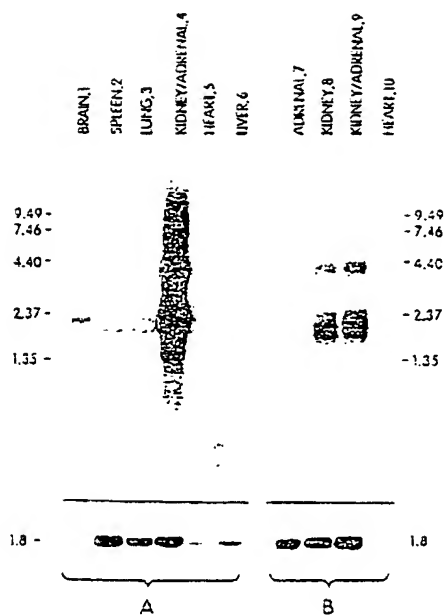


Fig. 3

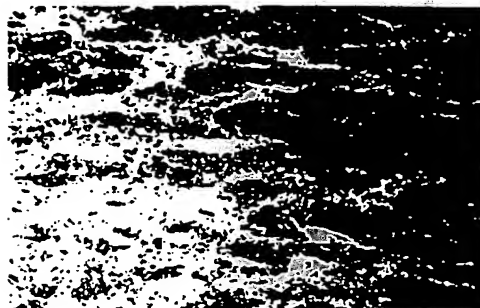


Fig. 4A

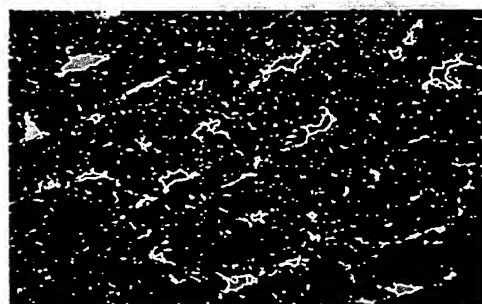


Fig. 4B



Fig. 5A

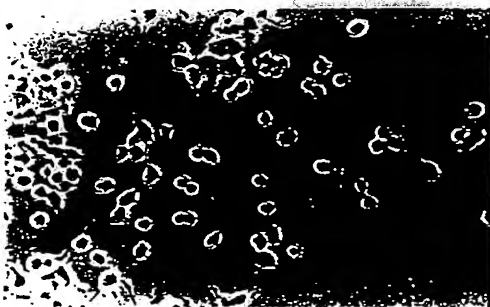


Fig. 5B

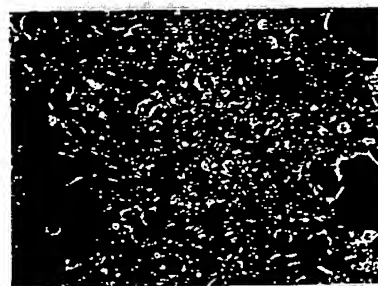


Fig. 6A

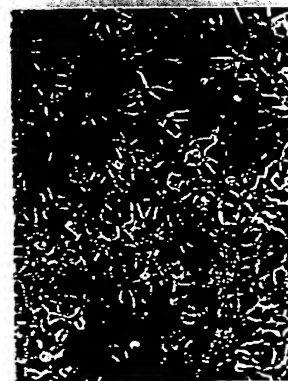


Fig. 6B

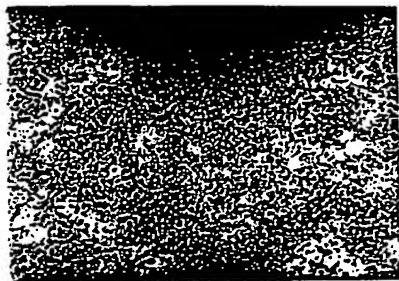


Fig. 6C



Fig. 6D



Fig. 7

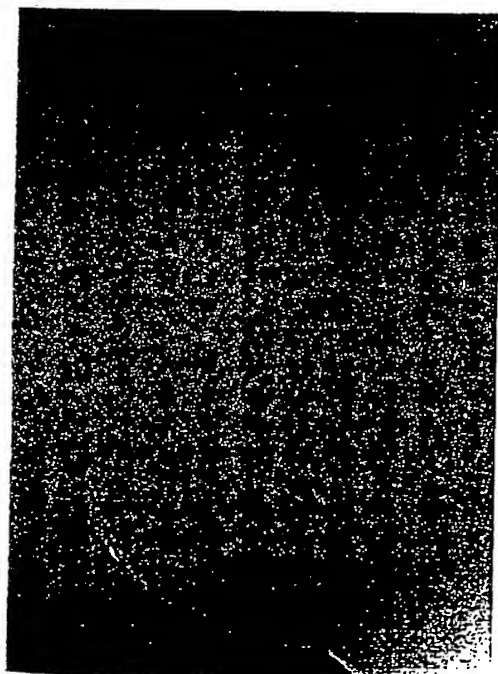


Fig. 8A



Fig. 8B

平成5年9月10日

特許庁長官 森 生 茂 殿

1. 特許出願の表示 PCT/US92/01968

2. 発明の名称 タンパク質により誘導される形態形成

3. 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国 01748 マサチューセッツ、ホプキントン、
サウス ストリート 35

名 称 クリニイティブ バイオモレキュルズ インコーポレイテッド
国 籍 アメリカ合衆国

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区麹町5丁目4番

クロスサイドビル7階

郵便番号102 電話3288-2791~2792

氏 名 (9094)弁理士 堀 野 清 也

5. 補正書の提出年月日 1992年10月9日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の写し(翻訳文)

1通

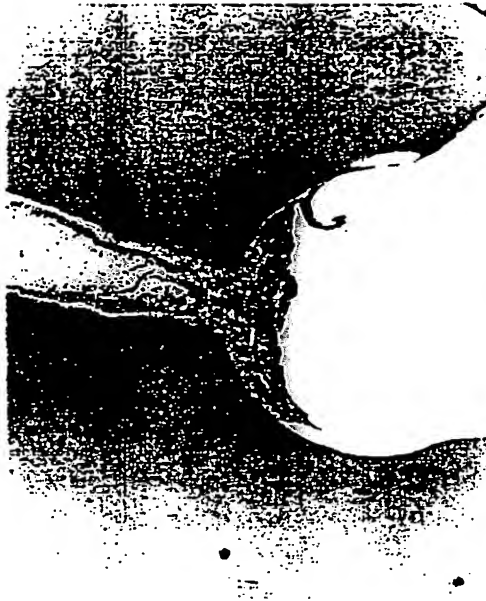


Fig. 8C

英文明細書第113頁第5行から同頁第31行
(明細書翻訳文第143頁下から2行から第144頁第17行)

6. 哺乳動物の組織局所に非軟骨形成性の置換組織の形成を誘導するための組成物であって、形態形成を許容する組織特異な環境を提供することができる、生体適合性のある非細胞マトリックスと、前記マトリックス上に吸収させ、置換組織を必要とする組織特異の局所に与えたとき、前記局所に複数の発達段階をたどる組織形態形成を誘導することができるようなモルフォゲンを含むもの。
7. 請求項5または6の組成物であって、前記マトリックスが体内で分解され得るものである組成物。
8. 請求項5または6の組成物であって、前記マトリックスが器官特異の組織から作られたものである組成物。
9. 請求項5または6の組成物であって、前記マトリックスが、コラーゲンおよびグリコサミノグリカン類およびプロテオグリカン類からなるグループから選ばれる細胞付着因子群を含むもの。
10. 請求項5または6の組成物であって、前記マトリックスが前記哺乳動物の体からの移動してくる胚源細胞群の付着、分化および増殖を許容する構造を持つもの。

英文明細書第116頁第8行から第117頁第28行
(明細書翻訳文第146頁第18行から第148頁第10行)

22. 請求項21の方法であって、前記非軟骨形成組織が肝組織であり、前記組織局所が肝臓である方法。
23. 請求項22の方法であって、前記プロテインが生体適合性のある非細胞性のマトリックスとともに前記局所に与えられる方法。
24. 請求項23の方法であって、前記マトリックスが前記組織に特異性のある成分群を含むものである方法。
25. 請求項23の方法であって、前記マトリックスが体内で分解され得るものである方法。
26. 請求項23の方法であって、前記マトリックスが器官特異の組織から作られるものである方法。
27. 請求項23の方法であって、前記マトリックスがコラーゲンおよび前記組織に特異の細胞付着因子群を含む方法。
28. 請求項23の方法であって、前記マトリックスが前記哺乳動物の体から移動してくる胚源細胞群の付着、分化および増殖を許容する構造を持つもの。
29. 請求項15、17、19または21の方法であって、前記モルフォゲンがhOP1(SEQ. ID No. 5)、mOP1(SEQ. ID No. 8)、hOP2(SEQ. ID No. 7)、mOP2(SEQ. ID No. 8)、CBMP2A(fx)(SEQ. ID No. 9)、CBMP2B(fx)(SEQ.

1 D No. 10)、DPP (f x) (Seq. 1 D No. 11)、Vgl (f x) (Seq. 1 D No. 12)、Vgr-1 (f x) (Seq. 1 D No. 13) および GDF-1 (f x) (Seq. 1 D No. 14) から成るグループから選ばれた配列の1つと少なくとも70%の相溶性が有るアミノ酸配列を含むものである方法。

30. 哺乳動物の肝臓の損傷組織局所に肝組織の形成を誘導する方法であって、

少なくともhOP-1 (Seq. 1 D No. 5) のアミノ酸残基43-139を含むモルフェゲンの治療量を前記局所に与えることを含む方法。

31. ヒトの組織の機能不全を診断する方法であって、次のステップ

(a) ヒトの中に存在する内在性の抗-モルフェゲン抗体の濃度を検出するステップを、1つの時間間隔で繰り返すこと、

(b) 前記検出された濃度を比較すること、検出された濃度の変化が前記組織の状態を示す、を含む方法。

32. 組織の状態を評価する方法であって、前記組織中に存在するモルフェゲンの濃度を検出するステップを含む方法。

英文明細書第119/A頁第1行から第119/C頁第25行
(明細書図式第150頁左行から請求の範囲を追加)

45. 請求項35、36、37、38または41のモルフェゲンであって、一般配列1、2、3または4 (Seq. 1 D No. 1、2、3または4) で決められるアミノ酸配列を含むもの。

47. 請求項42、43、44または45の治療薬であって、一般配列1、2、3または4 (Seq. 1 D No. 1、2、3または4) で決められるアミノ酸配列を含むもの。

46. Seq. 1 D No. 5、6、7または8の残基43-149から構成されるアミノ酸配列を含む、請求項35、36、37、38または41のモルフェゲン。

47. 請求項46のモルフェゲンであって、前記モルフェゲンが、Seq. 1 D No. 5、6、7または8の残基38-139によって構成されるアミノ酸配列またはその対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

48. 請求項47のモルフェゲンであって、前記モルフェゲンが、Seq. 1 D No. 5、6、7または8の残基1-139によって構成されるアミノ酸配列またはその対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

49. 請求項35、36、37、38または41のモルフェゲンであって、Seq. 1 D No. 9 (CBMP-2A) の残基6-101、Seq. 1 D No. 10 (CBMP2B) の残基5-101、Seq. 1

D No. 11 (DPP) の残基6-102、Seq. 1 D No. 12 (Vgl) の残基5-102、Seq. 1 D No. 13 (Vgr-1) の残基6-102、Seq. 1 D No. 14 (GDF-1) の残基6-102、およびその対立異形、種異形および突然変異形からなるグループから選ばれたアミノ酸配列を含むもの。

50. 請求項49のモルフェゲンであって、Seq. 1 D No. 9 (CBMP-2A) の残基1-101、Seq. 1 D No. 10 (CBMP2B) の残基1-101、Seq. 1 D No. 11 (DPP) の残基1-102、Seq. 1 D No. 12 (Vgl) の残基1-102、Seq. 1 D No. 13 (Vgr-1) の残基1-102、Seq. 1 D No. 14 (GDF-1) の残基1-102およびその対立異形、種異形および突然変異形から選ばれたアミノ酸配列を含むもの。

51. 請求項42、43、44または45の治療薬であって、前記モルフェゲンがSeq. 1 D No. 3、6、7または8 (OP-1またはOP-2) の残基43-139によって決められるアミノ酸配列、またはその対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

52. 請求項51のモルフェゲンであって、前記モルフェゲンがSeq. 1 D No. 5、6、7または8の残基38-139によって決められるアミノ酸配列、またはその対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

53. 請求項52のモルフェゲンであって、前記モルフェゲンがSeq. 1 D No. 5、6、7または8の残基1-139によって決められるアミノ酸配列、またはその対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

54. 請求項42、43、44または45の治療薬であって、Seq. 1 D No. 9 (CBMP-2A) の残基6-101、Seq. 1 D No. 10 (CBMP2B) の残基6-101、Seq. 1 D No. 11 (DPP) の残基6-102、Seq. 1 D No. 12 (Vgl) の残基5-102、Seq. 1 D No. 13 (Vgr-1) の残基6-102、Seq. 1 D No. 14 (GDF-1) の残基6-102、およびその対立異形、種異形および突然変異形からなるグループから選ばれたアミノ酸配列を含むもの。

55. 請求項54のモルフェゲンであって、前記モルフェゲンが、Seq. 1 D No. 9 (CBMP-2A) の残基1-101、Seq. 1 D No. 10 (CBMP2B) の残基1-101、Seq. 1 D No. 11 (DPP) の残基6-102、Seq. 1 D No. 12 (Vgl) の残基1-102、Seq. 1 D No. 13 (Vgr-1) の残基6-102、Seq. 1 D No. 14 (GDF-1) の残基1-102、およびその対立異形、種異形および突然変異形からなるグループから選ばれたアミノ酸配列を含むもの。

補正書の写し(翻訳文)提出書(特許法第184条の8)

平成5年9月10日

特許庁長官 麻 生 渡 殿

1. 特許出願の表示 PCT/US92/01963

2. 発明の名称 タンパク質により誘導される形態形成

3. 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国 01748 マサチューセッツ、ホバキンソン、
サウス ストリート 35

名 称 クリニイティブ バイオモレキュルズ インコーポレイテッド
国 籍 アメリカ合衆国

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区麹町5丁目4番
クロスサイド麹町ビル7階

郵便番号102 電話3288-2791-2792

氏 名 (9094)弁理士 藤 野 清 也

5. 補正書の提出年月日 1993年3月9日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の写し(翻訳文)

1通



15. 始原細胞群の増殖を刺激するのに十分なある濃度とある時間、始原細胞群をモルフォゲンと接触させるステップを含むことからなる、始原細胞群個体数を増加させる方法。

英文明細書第114頁第1行から同頁第34行

(明細書翻訳文第144頁第18行から第145頁第18行)

11. 請求項1、2、5または6の組成物であって、前記モルフォゲンが、hOP1(Seq. ID No. 5)、mOP1(Seq. ID No. 6)、hOP2(Seq. ID No. 7)、mOP2(Seq. ID No. 8)、CBMP2A(fx)(Seq. ID No. 9)、CBMP2B(fx)(Seq. ID No. 10)、DPP(fx)(Seq. ID No. 11)、Vgl(fx)(Seq. ID No. 12)、Vgr-1(fx)(Seq. ID No. 13)およびGDF-1(fx)(Seq. ID No. 14)からなるグループから選ばれた配列の1つと少なくとも70%の相同性があるアミノ酸配列を含むもの。

12. 請求項11の組成物であって、前記モルフォゲンが、前記グループから選ばれた配列の1つと少なくとも80%の相同性のあるアミノ酸配列を含むもの。

13. 請求項2の組成物であって、前記モルフォゲンがSeq. ID No. 5(hOP1)の残基43-139の配列と60%よりも大きい同一性があるアミノ酸配列を含むもの。

14. 請求項13の組成物であって、前記モルフォゲンがSeq. ID No. 5(hOP1)の残基43-139の配列と65%よりも大きい同一性があるアミノ酸配列を含むもの。

英文明細書第118頁第7行から第119頁第29行

(明細書翻訳文第148頁第17行から第150頁第7行)

34. 請求項33の方法であって、前記モルフォゲンがhOP1(Seq. ID No. 5); mOP1(Seq. ID No. 6); hOP2(Seq. ID No. 7); mOP2(Seq. ID No. 8); CBMP2A(fx)(Seq. ID No. 9); CBMP2B(fx)(Seq. ID No. 10); DPP(fx)(Seq. ID No. 11); Vgl(fx)(Seq. ID No. 12); Vgr1(fx)(Seq. ID No. 13); およびGDF1(fx)(Seq. ID No. 14)で構成されるグループから選ばれたものである方法。

35. 非軟骨形成性の哺乳動物の組織の成長の誘導において用いる医薬品の製造のためのモルフォゲンの使用。

36. 体外で始原細胞の増殖の誘導体として使用する医薬品の製造のためのモルフォゲンの使用。

37. 哺乳動物の静止または老衰した分化細胞群の表現型の維持に用いる医薬品の製造のためのモルフォゲンの使用。

38. 肝組織の成長の誘導に用いる医薬品の製造のためのモルフォゲンの使用。

39. 請求項35、36、37または38の使用であって、前記モルフォゲンが、hOP1(Seq. ID No. 5)、mOP1(Seq. ID No. 6)、

hOP2 (Seq. ID No. 7)、mOP2 (Seq. ID No. 8)、CBMP2A (f x) (Seq. ID No. 9)、CBMP2B (f x) (Seq. ID No. 10)、DPP (f x) (Seq. ID No. 11)、Vgl (f x) (Seq. ID No. 12)、Vgr1 (f x) (Seq. ID No. 13) および GDF1 (f x) (Seq. ID No. 14) から成るグループから選ばれた配列の1つと少なくとも70%の相同性を有するアミノ酸配列を含むもの。

40. 請求項39の使用であって、前記モルフォゲンが、前記グループから選ばれた配列の1つと少なくとも80%の相同性を有するアミノ酸配列を含むもの。

41. 腫瘍細胞の成長を抑制するための医薬品の製造のためのモルフォゲンの使用。

42. 癌の治療薬の製造のためのモルフォゲンの使用。

43. 非軟骨形成性の組織の成長を誘導する治療薬の製造のためのモルフォゲンの使用。

44. 静止または老衰した分化細胞群の表現型の発現を誘導する治療薬の製造のためのモルフォゲンの使用。

45. 体外で骨組織の増殖を誘導する治療薬の製造のためのモルフォゲンの使用。

9 (CBMP-2A) の残基6-101、Seq. ID No. 10 (CBMP2B) の残基6-101、Seq. ID No. 11 (DPP) の残基6-102、Seq. ID No. 12 (Vgl) の残基6-102、Seq. ID No. 13 (Vgr-1) の残基6-102、Seq. ID No. 14 (GDF-1) の残基6-102、およびその対立異形、種異形および突然変異形からなるグループから選ばれたアミノ酸配列を含むもの。

52. 請求項51の使用であって、前記モルフォゲンが、Seq. ID No. 9 (CBMP-2A) の残基1-101、Seq. ID No. 10 (CBMP2B) の残基1-101、Seq. ID No. 11 (DPP) の残基1-102、Seq. ID No. 12 (Vgl) の残基1-102、Seq. ID No. 13 (Vgr-1) の残基1-102、Seq. ID No. 14 (GDF-1) の残基1-102 およびその対立異形、種異形および突然変異形から選ばれたアミノ酸配列を含むもの。

53. 請求項42、43、44または45の使用であって、前記モルフォゲンが、Seq. ID No. 5、6、7または8 (OP-1またはOP-2) の残基43-139によって決められるアミノ酸配列、またはその対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

54. 請求項53の使用であって、前記モルフォゲンがSeq. ID No. 5、6、7または8の残基43-139によって決められるアミノ酸配列、またはその

英文明細書第119/A頁第1行から第119/C頁第26行
(明細書第150頁末行から請求の範囲を追加)

46. 請求項35、36、37、38または41の使用であって、前記モルフォゲンが、一般配列1、2、3または4 (Seq. ID No. 1、2、3または4) で決められるアミノ酸配列を含むもの。

47. 請求項42、43、44または45の使用であって、前記モルフォゲンが、一般配列1、2、3または4 (Seq. ID No. 1、2、3または4) で決められるアミノ酸配列を含むもの。

48. 請求項35、36、37、38または41の使用であって、前記モルフォゲンが、Seq. ID No. 5、6、7または8の残基43-139によって構成されるアミノ酸配列またはその対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

49. 請求項46の使用であって、前記モルフォゲンが、Seq. ID No. 5、6、7または8の残基38-139によって構成されるアミノ酸配列またはその対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

50. 請求項47の使用であって、前記モルフォゲンが、Seq. ID No. 5、6、7または8の残基1-139によって構成されるアミノ酸配列またはその対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

51. 請求項35、36、37、38または41の使用であって、前記モルフォゲンが、Seq. ID No.

対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

55. 請求項54の使用であって、前記モルフォゲンが、Seq. ID No. 5、6、7または8の残基1-139によって決められるアミノ酸配列、またはその対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

56. 請求項42、43、44または45の使用であって、前記モルフォゲンが、Seq. ID No. 9 (CBMP-2A) の残基6-101、Seq. ID No. 10 (CBMP2B) の残基6-101、Seq. ID No. 11 (DPP) の残基6-102、Seq. ID No. 12 (Vgl) の残基6-102、Seq. ID No. 13 (Vgr-1) の残基6-102、Seq. ID No. 14 (GDF-1) の残基6-102、およびその対立異形、種異形および突然変異形からなるグループから選ばれたアミノ酸配列を含むもの。

57. 請求項56のモルフォゲンの使用で、前記モルフォゲンが、Seq. ID No. 9 (CBMP-2A) の残基1-101、Seq. ID No. 10 (CBMP2B) の残基1-101、Seq. ID No. 11 (DPP) の残基1-102、Seq. ID No. 12 (Vgl) の残基1-102、Seq. ID No. 13 (Vgr-1) の残基1-102、Seq. ID No. 14 (GDF-1) の残基1-102、およびその対立異形、種異形および突然変異形からなるグループから選ばれたアミノ酸配列を含むもの。

フロントページの続き

(72) 発明者 クベラサムバス、サンゲーベル
アメリカ合衆国 02053 マサチューセッ
ツ、メドウエイ、スプリング ストリート
6
(72) 発明者 バング、ロイ エッチ、エル、
アメリカ合衆国 02053 マサチューセッ
ツ、メドウエイ、キンバリー ドライブ
16

(72) 発明者 オバーマン、ハーマン
アメリカ合衆国 02053 マサチューセツ
ツ、メドウェイ、サマー ヒル ロード
25
(72) 発明者 ルーガー、ディヴッド シー。
アメリカ合衆国 01748 マサチューセツ
ツ、ホブキントン、ダウネイ ストリート
19

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成12年9月12日(2000.9.12)

【公表番号】特表平6-506360

【公表日】平成6年7月21日(1994.7.21)

【年通号数】

【出願番号】特願平4-509427

【国際特許分類第7版】

C12N 15/09 ZNA

A61K 35/12

38/00

A61P 19/00

43/00 105

C07K 14/51

C12N 5/00

5/06

5/10

// C12P 21/02

【F I】

C12N 15/00 ZNA A

A61K 35/12

A61P 19/00

43/00 105

C07K 14/51

C12P 21/02 C

C12N 5/00

B

E

A61K 37/02

予 定 補 正 書

補 正 の 範 囲

平成11年3月11日

特許庁長官 伊藤山 茂 君

1. 事件の表示 平成4年特許第309427号

2. 補正をする者
事件との関係 特許出願人

名 称 クラニイティブ バイオモレキュルズ インコーポレイテッド

3. 代 理 人
住 所 東京都新宿区西谷1丁目2番1号
二井ビル8階

郵便番号 160-0004 電話 3323-6871

氏 名 (001) 井岡士 藤 野 清 雄

1. 補正対象項目名 明細書
2. 補正対象項目名 請求の範囲
3. 補正の内容 請求の範囲を別紙のとおり補正する。

1. a) 形成された非骨格組織、及び
b) ヒトOP-1のC末端の7シスチン残基、SEQ ID NO: 5の28-139残基と少なくとも70%の相同性をもつアミノ酸配列を有する糖鎖モルフォゲンを含む、該モルフォゲンが骨形成の生体内試験において、成骨性骨の形成を誘導する組成物。
2. 該モルフォゲンが、ヒトOP-1のC末端の7シスチン残基と少なくとも80%の相同性をもつアミノ酸配列を有する請求項1の組成物。
3. 形成された非骨格組織が、肝臓、腎臓、皮膚、骨髄の肉芽、筋、心臓、血管及び神経組織からなる群から選択された組織を含む請求項1の組成物。
4. 分化した哺乳動物の非骨格組織を、ヒトOP-1のC末端の7シスチン残基、SEQ ID NO: 5の28-139残基と少なくとも70%の相同性をもつアミノ酸配列を有するモルフォゲンと接触させるステップを含む、該モルフォゲンが骨形成の生体内試験において成骨性骨の形成を誘導する分化した哺乳動物の非骨格組織に特有の機能を回復させる方法。
5. 該モルフォゲンが、ヒトOP-1のC末端の7シスチン残基と少なくとも80%の相同性をもつアミノ酸配列を有する請求項4の方法。
6. 該非骨格組織が、肝臓、腎臓、皮膚、骨髄の肉芽、筋、心臓、血管及び神経組織からなる群から選択された組織を含む請求項4の方法。
7. 形成されて増殖するのに十分な濃度と時間、生体外でモルフォゲンに暴露された哺乳動物の細胞集団を含む、哺乳動物の組織形成の増進させる組成物。
8. 哺乳動物の組織形成所で非骨格組織の形成を誘導する組成物であって、組織に特異的な成分を含む、形態形成を許容する組織特異的な要素を提供することが出来る生体適合性のある非細胞のマトリックスと、該マトリックス上で吸収

され、直接組織を必要とする哺乳動物の組織形成部位に於て与えられたとき、該部位に成骨の発現段階をたどる組織形成形成を誘導することができるようなモルフォゲンを含む組成物。

9. 非骨格組織が培養されて増殖するのに十分な濃度と時間、該非骨格組織を生体外でモルフォゲンと接触させるステップを含む、哺乳動物の組織形成の増進を生体外で増進させる方法。

10. 組織中のモルフォゲン濃度を検出、比較し、検出された濃度と濃度の変化が組織形成の増進を誘導するためのモルフォゲンの使用。

11. a) 骨又は骨組織、または骨の組織のような哺乳動物の非骨格組織の形成を誘導する、または

b) 生体内または生体外で哺乳動物の組織形成の増進を誘導する、または

c) 哺乳動物の老化したまたは休止した分化細胞の表現型を維持または回復させる、

ための組織の増進へのモルフォゲンの使用。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.